



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

Bases celulares y moleculares de la atrofia muscular espinal (AME): alteraciones de las fibras musculares esqueléticas (FME) que conducen a la disfunción motora.

Cellular and molecular basis of spinal muscular atrophy (SMA): alterations of skeletal myofibers (MioE) that lead to motor dysfunction.

Autora: Rocío Rodríguez Seoane

Director: D. Miguel A. Lafarga Coscojuela

Santander, junio 2020

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a Miguel que me ha enseñado y acompañado desde que entré a la facultad hasta el punto final de este trabajo, y con él, de mi carrera. También quiero dar las gracias a Maite que hace mucho tiempo me enseñó que aquello que me hace diferente lo tengo dentro y que se necesitan más mujeres que alcen la voz. Espero algún día sentir y transmitir la pasión por mi trabajo de la misma forma en que vosotros lo hacéis.

Agradecer al resto de profesores que han marcado mi carrera y, de alguna forma, han moldeado la médica que, por fin, soy hoy.

Quiero dar las gracias a mis compañeras y compañeros de clase porque con otras personas todo hubiese sido distinto. Tampoco puedo olvidarme de quienes habéis compartido esta locura conmigo porque me habéis ayudado a encontrar el camino y a encontrarme a mí. Y a quienes que no comparten mi clase, pero si comparten mi vida, Anita, Jeru, Jose. Gracias por regalarme los mejores años de mi vida.

A mis padres y mi abuela, que han vivido mis éxitos y fracasos esperándome siempre al otro lado de la puerta de mi habitación. A mi hermano que me recuerda todos los días la persona que quiero ser. Y al resto de mi familia por acompañarme.

A Olga que lleva enseñándome quién soy toda la vida.

Por último, dar las gracias a mis amigas de la infancia y la adolescencia por ser mi red de seguridad. Y, sobre todo, a Guzón, que esta carrera, como todo lo que hago, es mitad tuya y mitad mía.

ÍNDICE

Palabras clave.....	5
Abstract.....	6
Resumen.....	6
1.Introducción.....	7
2.Metodología.....	9
3. Planteamiento general de la atrofia muscular espinal (AME)	9
4. Genética de la AME.....	10
5. Clasificación clínica de la AME.....	12
6. La proteína de supervivencia de las motoneuronas (AME)	14
6.1 Estructura molecular de SMN.....	15
6.2. Función de la SMN en la biogénesis de snRNPS espliceosomales.....	16
6.3. Participación de la SMN en el ensamblaje molecular de los cuerpos nucleares de Cajal (“Cajal Bodies”, CBs)	19
6.4. Función de la SMN en el transporte axonal de mRNAs	19
6.5. SMN y traducción.....	21
6.6. Contribución de la SMN a la dinámica del citoesqueleto de actina.....	22
6.7. SMN y la vía de endocitosis-autofagia.....	23
7. Estructura y función de las miofibras esqueléticas (FME)	25
7.1 Introducción al músculo esquelético.....	25
7.2. Estructura general de la FME.....	26
7.3. La sarcómera como unidad estructural y funcional de contracción.....	27
7.4. Organización de los miofilamentos en la sarcómera	28
7.5. Bases moleculares de la contracción muscular.....	30

8. Alteraciones de las motoneuronas (MNs)	31
8.1 Análisis histológico de las MNs del asta anterior de la médula espinal.....	31
8.2 Alteración de los CBs y redistribución de la coilina	33
8.3 Reorganización del nucleolo en las MNs SMN Δ 7.....	35
8.4 Alteraciones citoplasmáticas de la maquinaria de síntesis proteica.....	37
8.5 Señales de estrés celular y degeneración neuronal.....	38
9. Alteraciones de las miofibras esqueléticas.....	39
9.1 Desarrollo de una miopatía neurogénica por la degeneración de las MNs	40
9.2 Distribución sarcomérica de SMN en las FME.....	41
9.3 Interacción de SMN con otras proteínas sarcoméricas.....	42
9.4 Alteraciones de las FME derivadas de la disminución de SMN.....	43
10. Referencias.....	47

PALABRAS CLAVE

Atrofia muscular espinal (AME).

Proteína de supervivencia de las motoneuronas (SMN).

Miofibras esqueléticas (FME).

Motoneuronas (MNs).

ABSTRACT

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is caused by the mutation or deletion of the *SMN1* gene, which encodes the motor neuron survival protein (SMN). As a consequence, SMN production falls on the *SMN2* gene encoding a transcript lacking exon 7. The absence of this exon makes the resulting protein highly unstable and it rapidly degrades by the ubiquitin-proteasome pathway. For this reason, the concentration of SMN in the body of patients with SMA will mainly depend on the *SMN2* gene. Thus, the different phenotypes of the disease will be correlated with the number of copies of the *SMN2* gene that they possess.

SMN is a ubiquitous protein that is involved in numerous essential processes for the organism such as the biogenesis of spliceosomal snRNPs, axonal trafficking or the translation of mRNAs. Therefore, the decrease in SMN produces cellular alterations that preferentially affect the neuromuscular system and will be the main responsible for the clinic of patients with SMA. In recent years, the study of the possible primary role of SMN deficiency in SMA myopathy has become especially relevant. In particular, SMN has been shown to be a sarcomeric protein and its deficit in SMA intrinsically affects the dynamics of actin filaments causing focal or segmental lesions in MioE. This primary involvement is independent of secondary neurogenic myopathy due to denervation, which coexists in SMA.

RESUMEN

La Atrofia Muscular Espinal (AME) está causada por la mutación o delección del gen *SMN1*, que codifica la proteína de la supervivencia de las motoneuronas (SMN). Como consecuencia, la producción SMN recae sobre el gen *SMN2* que codifica un transcrito carente de exón 7. La ausencia de este exón hace que la proteína resultante sea altamente inestable y se degrade rápidamente por la vía ubiquitin-proteasoma. Por ello, la concentración de SMN en el organismo de los pacientes con AME dependerá exclusivamente del gen *SMN2*. Así, los distintos fenotipos de la enfermedad se correlacionarán con el número de copias del gen *SMN2* que posean.

SMN es una proteína ubicua que interviene en numerosos procesos esenciales para el organismo como la biogénesis de snRNPs espliceosomales, el tráfico axonal o la traducción de mRNAs. Por lo tanto, la disminución de SMN produce alteraciones celulares que afectan preferentemente al sistema neuromuscular y serán las responsables fundamentales de la clínica de los pacientes con AME. En los últimos años ha cobrado especial relevancia el estudio del posible papel primario del déficit de SMN en la miopatía de la AME. En particular, se ha demostrado que SMN es una proteína sarcomérica y su déficit en la AME afecta intrínsecamente a la dinámica de los filamentos de actina ocasionando lesiones focales o segmentarias en las FME. Esta afectación primaria es independiente de la miopatía neurogénica secundaria, por denervación, que coexiste en la AME.

1. INTRODUCCIÓN

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad neurodegenerativa, autosómica recesiva que constituye la principal causa de muerte infantil a consecuencia de una enfermedad genética, pues afecta a 1 de cada 6.000-10.000 nacidos vivos. Esta enfermedad es la resultante de la mutación o, más frecuentemente, la delección del gen *SMN1* presente en el brazo largo del cromosoma 5, en concreto, en una región de alta inestabilidad genómica (Lefevbre et al., 1995; Wirth, 2000; Bottai and Adami, 2013). Este gen es el encargado de codificar la proteína de la supervivencia de las motoneuronas (SMN), una proteína ubicua en el organismo y esencial para la supervivencia del individuo pues es la responsable de funciones cardinales como la maduración de diferentes ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) y nucleolares (snoRNPs) e interviene en otros procesos fundamentales para la homeostasis como son el transporte axonal o el ensamblaje de los cuerpos nucleares de Cajal (“Cajal bodies”, CBs).

Los pacientes con AME presentan una reducción drástica de los niveles de SMN debido a la delección del gen telomérico *SMN1*. Sin embargo, SMN está codificada también por un gen centromérico, denominado *SMN2*, generado por la duplicación invertida del gen *SMN1*. Ambos genes son prácticamente idénticos y solo difieren en 5 pares de bases. Esta diferencia es fundamental pues induce un cambio de base que activa un silenciador del splicing que impide la lectura del exón 7 en aproximadamente el 90% de los transcritos conocidos como SMN Δ 7. Como consecuencia, el gen *SMN2* codifica una isoforma trunca e inactiva de la proteína SMN que se degrada rápidamente por la vía ubiquitina-proteasoma (Singh et al., 2006; Tisdale and Pellizzoni, 2015; Chaytow et al., 2018).

En condiciones fisiológicas, la contribución del gen *SMN2* a la producción total de SMN es mínima (Liu and Dreyfuss, 1996). Sin embargo, en los pacientes con AME la alteración de ambos alelos de *SMN1* implica la pérdida de gran parte de la producción de SMN, por lo que la síntesis de SMN es dependiente del gen *SMN2*. Por ello, el fenotipo del paciente dependerá del número de copias del gen *SMN2* que disponga el individuo. Por este motivo, la AME es una enfermedad que presenta un amplio espectro clínico (Tisdale and Pellizzoni, 2015; Chaytow et al., 2018).

Como ya se ha introducido, la AME es una enfermedad cuya clínica dependerá de la concentración de SMN en el organismo afecto. Atendiendo a este criterio, se pueden clasificar los distintos fenotipos de AME en cinco categorías designadas del cero al cuatro en función de su gravedad. Así, el tipo 0 es una enfermedad que conlleva la muerte prenatal mientras que los pacientes afectados de AME tipo 4 son individuos con un desarrollo motor y una esperanza de vida prácticamente idénticos a la población general (D’Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET). En relación con la clínica, hay que destacar que la expresión más frecuente de la enfermedad es la AME tipo I pues constituye aproximadamente el 50% de los casos de AME existentes. Estos pacientes presentan una combinación de hipotonía severa y debilidad muscular, frecuentemente simétrica y proximal que afecta predominantemente a las extremidades inferiores y los músculos faciales. Limitando el desarrollo motor de los pacientes e impidiendo que alcancen hitos motores como la sedestación sin apoyo. Además, hay que tener en cuenta que no se trata únicamente de una alteración de la marcha, sino que es una

enfermedad degenerativa que afecta a diferentes estructuras musculares, de manera que la clínica va evolucionando hasta provocar la debilidad de los músculos intercostales y el diafragma conduciendo a un fallo respiratorio que llega a provocar la muerte del paciente (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET).

El cuadro clínico de la AME se basa principalmente en una afectación neuromuscular de carácter degenerativo producida por la pérdida de las motoneuronas (MNs). Por ello, tradicionalmente se ha considerado la AME como el arquetipo de enfermedad que afecta a las α -MNs del asta anterior de la médula espinal, sin embargo, existe una evidencia firme de que esta patología también afecta a tejidos extraneurales entre los que se encuentran el hígado, el páncreas, los vasos sanguíneos y, especialmente, el músculo estriado esquelético (Martínez-Hernández et al., 2009; Berciano et al., 2020).

Con el objetivo de detallar las bases celulares y moleculares de la AME en esta revisión se ha hecho un estudio de la bibliografía existente profundizando en la afectación tanto de las MNs como de las miofibras esqueléticas (FME). Por un lado, se conoce que la principal diana patogénica de la enfermedad son las MNs del asta anterior de la médula espinal y que la deficiencia de SMN repercute directamente sobre la funcionalidad de las mismas. Por ejemplo, en los pacientes con AME tipo I se presenta una alteración del ensamblaje de los cuerpos nucleares de Cajal (CBs), con redistribución de la coilina, así como una reorganización del nucléolo que, en conjunto, reflejan una alteración en el funcionamiento de la maquinaria de procesamiento de los mRNAs y de la síntesis proteica. Además de estas alteraciones se inducen respuestas de estrés celular (Tapia et al., 2012; Tapia et al., 2017). Todo ello conduce a la degeneración y pérdida de MNs y subsecuente atrofia de las FME (Berciano et al., 2020a). Por otro lado, está emergiendo con fuerza la idea de que el déficit de SMN afecta primariamente a las FME. Así, se ha demostrado que SMN es una proteína sarcomérica y su expresión en la sarcómera está alterada en segmentos de fibras hipertróficas, no afectadas por la denervación, en pacientes con AME tipo I y en el modelo murino SMN Δ 7 de AME. Estos hallazgos apoyan el criterio de una afectación intrínseca del déficit de SMN en las FME que, junto con la atrofia por denervación, contribuye de manera esencial a la miopatía en la AME (Castillo-Iglesias et al., 2019; Berciano et al., 2020 a, b).

Finalmente, saber que, aunque el horizonte terapéutico de los pacientes con AME no es especialmente optimista, existen distintos estudios que avalan la utilidad de un nucleótido antisentido, denominado Nusinersen (SpinrazaTM), que promueve la inclusión del exón 7 en los transcritos codificados por *SMN2*. Así, la isoforma de SMN obtenida será la proteína completa y no una isoforma truncada e inestable de rápida degradación. Con este cambio se ha conseguido recuperar el correcto ensamblaje de los CBs y normalizar el procesamiento de mRNAs celulares en el modelo murino SMN Δ 7 de AME (Berciano et al., 2020b).

2. METODOLOGÍA

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) ha sido planteado en forma de revisión bibliográfica, basándose fundamentalmente en artículos indexados en PubMed y páginas dedicadas a la AME. En particular, la bibliografía revisada se ha centrado en: i) características clínicas de la AME, ii) estructura y función de la proteína SMN, iii) organización de las fibras musculares estriadas esqueléticas, iv) alteraciones de las motoneuronas en la AME y v) alteraciones primarias de las fibras musculares esqueléticas en pacientes de AME y en modelos de ratón de la enfermedad. Dicha revisión ha sido complementada con el análisis de microscopía óptica y electrónica de un modelo experimental de AME, del que se han obtenido algunas de las imágenes presentadas en este TFG.

3. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL (AME)

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad infantil y neurodegenerativa, autosómica recesiva, caracterizada, entre otros procesos, por la degeneración de las motoneuronas alfa (en lo sucesivo, MNs) de las astas anteriores de la médula espinal (Lefebvre et al., 1995; Lefebvre et al., 1997). Esta degeneración conlleva la instauración de un patrón miopático que determina la atrofia progresiva de los músculos proximales con debilidad y parálisis muscular que, en los casos más severos, evoluciona hasta un estadio final en el que se desarrolla el fallo respiratorio y, con ello, la muerte del individuo (Munsat and Davies, 1992).

A pesar de que las alteraciones relativas a las MNs son las más representativas y conocidas -de forma tradicional- de la enfermedad, no hay que olvidar que la AME es una enfermedad compleja, multifactorial y multisistémica. Así, en su patogenia también está implicada la disfunción de otros circuitos motores que probablemente afecten a otras subpoblaciones neuronales (Tisdale and Pellizzoni, 2015). Incluso se produce la afectación primaria de otras células, tejidos y órganos, como las fibras musculares estriadas esqueléticas o miofibras esqueléticas (FME) en las que se puede observar la coexistencia de regiones de atrofia e hipertrofia además de alteraciones sustanciales tanto en el tamaño como en la organización de los mionúcleos (Castillo-Iglesias et al., 2019).

En la definición de AME se estableció que es una patología de herencia autosómica recesiva directamente relacionada con la delección o, con muy baja incidencia, mutación homocigota del gen *SMN1* ("Survival Motor Neuron 1") que se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (Bottai and Adami, 2013), en concreto, en la región (q11.2-q13.35q3) que tiene gran inestabilidad genómica (Lefebvre et al., 1995; Wirth, 2000; Markowitz et al., 2012; Narcís et al., 2019). La delección, mutación o conversión homocigota del gen *SMN1* es directamente responsable de la aparición de la AME, puesto que la proteína SMN codificada por dicho gen es una proteína ubicua en el organismo y esencial para la supervivencia de los vertebrados. En particular, la proteína SMN es responsable de la maduración de varias familias de ribonucleoproteínas nucleares y nucleolares de pequeño tamaño, snRNPs y snoRNPs, respectivamente. Tales RNPs son fundamentales para el procesamiento de pre-mRNAs

(splicing), además de participar en el transporte axonal. Su importancia funcional será comentada en profundidad en los apartados siguientes.

Existe otro gen fundamental que es el gen *SMN2* que constituye un factor determinante en la gravedad de la AME, pues, dependiendo del número de copias, el cuadro clínico neuromuscular será de mayor o menor grado. Así, se podría concluir que el gen *SMN1* es el responsable de la aparición de la AME y el gen *SMN2* es un modificador de la gravedad.

En relación con su epidemiología, se trata de una enfermedad con un gran impacto en la sociedad, especialmente en el campo de la pediatría, pues es la principal causa de muerte infantil por una enfermedad genética y la segunda enfermedad autosómica recesiva más frecuente después de la fibrosis quística. La AME afecta a 1 de cada 6.000-10.000 nacidos y se estima que 1:35-1:50 individuos es portador de la enfermedad (Tisdale and Pellizzoni, 2015).

Por lo tanto, a pesar de que la AME se considera una enfermedad rara, su impacto devastador en la población unido a la gravedad de la enfermedad y al hecho de que se trata de una enfermedad monogénica de transmisión mendeliana -aunque el 2% de los casos está producido por mutaciones de novo-, hacen de la AME una enfermedad especialmente interesante para el estudio de sus bases moleculares, patogenia y transmisión, lo que se corresponde con el objetivo del presente trabajo.

4. GENÉTICA DE LA AME

La proteína SMN está codificada por dos genes presentes en el brazo largo del cromosoma 5, en concreto en la región 5q13, estos son los genes *SMN1* -telomérico- y *SMN2* -centromérico-. Una peculiaridad que presentan ambas secuencias génicas, y que las hace prácticamente idénticas, es que *SMN2* se produjo como consecuencia de una duplicación invertida de *SMN1*, proceso evolutivo solamente presente en el *Homo sapiens* (Rochette et al., 2001; Chaytow and Huang et al., 2018).

Ambos genes proceden de una secuencia génica común y difieren únicamente en 5 bases (Chaytow and Huang et al., 2018). Variación de suma importancia, pues en el gen *SMN2* se presenta un cambio de base en el que se permuta la sexta citosina por una timina en el codón 280 del exón 7 de los 9 que tiene la proteína (Bottai and Adami, 2013). Este cambio es trascendental pues tiene un profundo impacto funcional, ya que interfiere con un potenciador del *splicing* y, concomitantemente, crea un silenciador que impide la lectura del exón 7. Como consecuencia se produce un *splicing* alternativo que conlleva la producción mayoritaria (80-85%) de un tipo de transcritos primarios, denominados SMN Δ 7, que carecen de exón 7 y codifican una forma trunca e inactiva de la proteína SMN que se degrada rápidamente por el proteasoma (Singh et al., 2006; Tisdale and Pellizzoni, 2015). El 15% restante de los transcritos codificados por *SMN2* contienen el exón 7 y codifican la proteína SMN completa y funcional (Narcís et al., 2019).

La omisión de la lectura del exón 7 se produce porque la transición C-T en el pre-mRNA de *SMN2* inactiva un potenciador del *splicing* e introduce una secuencia silenciadora, conocida como “intronic splicing silencer 1” (ISS1). Esta secuencia interacciona con las proteínas represoras del *splicing* hnRNP A1/A2, induciendo el *splicing* alternativo de *SMN2*, que excluye el exón 7 y da lugar a los transcritos SMN Δ 7. En segundo lugar, la pérdida del exón 7 hace que la proteína SMN no se pueda auto-oligomerizar, proceso fundamental para llevar a cabo sus funciones biológicas. Finalmente, saber que en estas circunstancias la proteína SMN pierde el motivo QNQKE de exportación nuclear y se le añade una secuencia de 4 aminoácidos (EMLA), codificada en el exón 8, que actúa como señal de degradación derivando a la proteína SMN truncada hacia su destrucción por el proteasoma (Figura 1) (Lorson and Androphy, 2000; Cho and Dreyfuss, 2010).

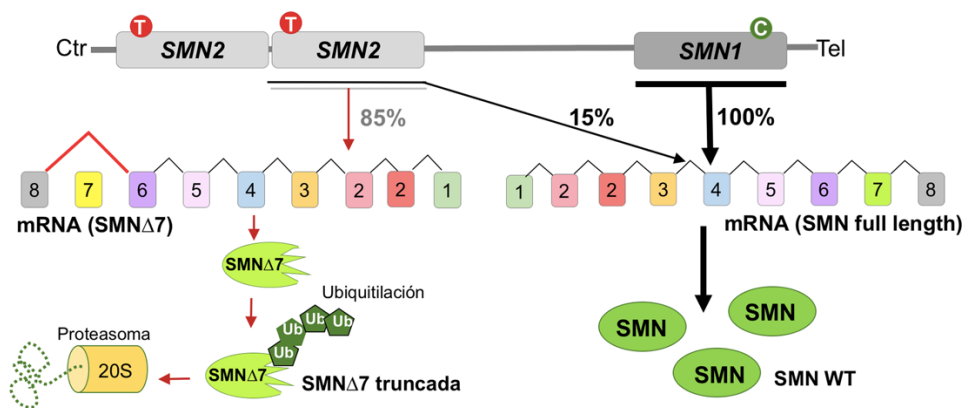


Figura 1. Splicing y splicing alternativo de los genes *SMN1* y *SMN2*; formación de SMN y la forma truncada SMN Δ 7. Tomado de Narcís et al., 2019.

En condiciones fisiológicas, el gen *SMN1* es el responsable de la producción del 90% de la cantidad de SMN, (Liu and Dreyfuss, 1996) puesto que únicamente el 10-15% de la producción codificada por el gen *SMN2* presenta una estabilidad y una funcionalidad adecuada. De este modo, en los pacientes con AME la alteración de ambos alelos del gen *SMN1* produce una expresión deficiente de SMN que no puede ser compensada con la escasa producción por parte del gen *SMN2* y consecuentemente el desarrollo de la clínica asociada a la AME.

Sin embargo, no todos los pacientes con AME tienen el mismo grado de afectación y, por tanto, de atrofia muscular, sino que existe un espectro de gravedad que abarca desde casos letales *intra-útero* hasta pacientes con una calidad y esperanza de vida iguales a la población general. Aquí reside el papel del gen *SMN2*, puesto que cuando el gen *SMN1* se ve afectado, los niveles de proteína SMN dependen exclusivamente del gen *SMN2* (Narcís et al., 2019). Así, cuanto mayor sea el número de copias de *SMN2* del paciente, mayor será la producción de transcritos de SMN funcionales que codifican la SMN completa, y, por lo tanto, menor será la gravedad clínica del paciente.

Bottai y Adami (2013) establecieron que la producción de SMN no es suficiente para asegurar una cantidad correcta de proteína funcional, a menos que el paciente tenga más de 2 copias del gen *SMN2*. Por consiguiente, el número de copias de *SMN2* es inversamente proporcional a la gravedad del cuadro de AME (Chaytow and Huang et al., 2019); de esta forma, los pacientes con AME tipo I presentan únicamente 2 copias del gen *SMN2*, los pacientes con AME tipo II presentan 3 y los pacientes con AME tipo III presentan hasta 4 copias del gen *SMN2*. Igualmente, los fenotipos ampliados tipo 0 (la más severa) y tipo IV (la más leve) presentarían menos de 2 y entre 4-6 copias del gen *SMN2*, respectivamente.

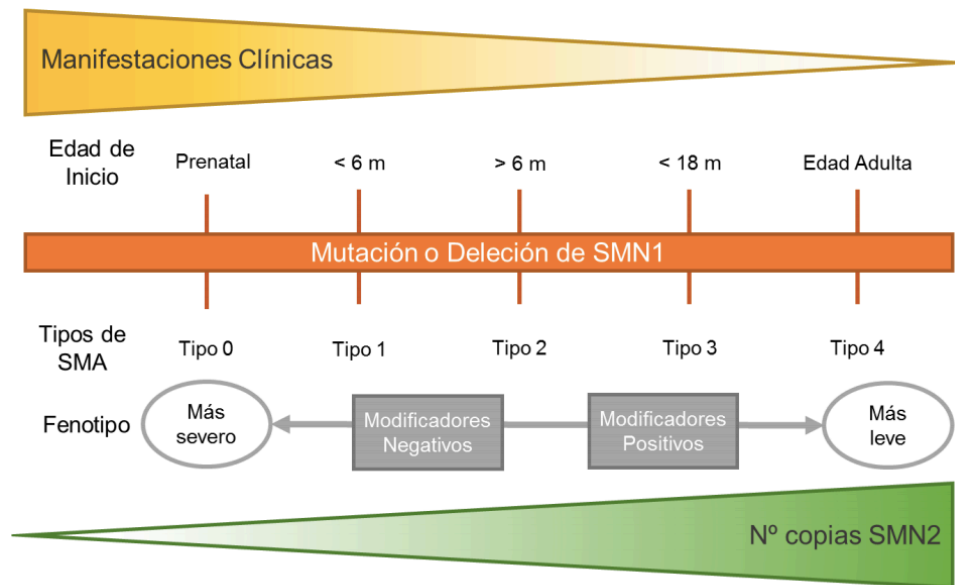


Figura 2. Espectro Clínico Continuo del Fenotipo de la AME; debut de las principales formas clínicas y relación con factores modificadores del fenotipo. Adaptado de Talbot & Tizzano, 2017 por Barquín, 2018.

5. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA AME

Los pacientes con AME se presentan en un amplio espectro clínico en términos de edad y gravedad de la enfermedad, lo que hace necesaria su clasificación en función de la edad de inicio y los hitos alcanzados en el desarrollo de la función motora (Tisdale and Pellizzoni, 2015). Así, se presentan los siguientes tipos de AME:

AME Tipo 0 o prenatal. Se trata de la forma más grave del espectro, pues las alteraciones tanto neuronales como musculares llevan a los pacientes a un nivel de atrofia tal, que les conduce a la muerte *intra-útero* o a los pocos meses tras el nacimiento debido a la parálisis de los músculos intercostales y diafragmáticos que conduce a una insuficiencia respiratoria aguda. (Tisdale and Pellizzoni, 2015). De hecho, en las formas más severas, la disminución de los movimientos intrauterinos del feto sugiere un inicio prenatal del cuadro en el que se presenta debilidad muscular severa y contracturas articulares al nacer (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET).

AME Tipo I, AME infantil o Enfermedad de Werning y Hoffmann. Es el tipo de AME más común pues se corresponde con aproximadamente el 50% de los casos, al mismo tiempo, es el segundo más severo de todo el espectro. Habitualmente, los pacientes recogidos en esta categoría presentan signos de la enfermedad de forma muy temprana, incluso antes de los 6 meses tras el nacimiento (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET).

En relación con la clínica, estos pacientes presentan una combinación de hipotonía severa y debilidad muscular, generalmente, simétrica y proximal con una especial afectación de las extremidades inferiores y la preservación de los músculos faciales. Este cuadro de hipotonía hace que los pacientes nunca adquieran la habilidad para sentarse sin apoyo y, si no se interviene sobre ellos, no suelen sobrevivir más allá de los 2 años. Los reflejos tendinosos profundos están ausentes o disminuidos, pero se preserva la sensibilidad (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET).

Asimismo, al inicio de la enfermedad la innervación y el tono del diafragma están preservados que, junto con la debilidad de los músculos intercostales da como resultado una respiración paradójica desde el nacimiento. No olvidar, que en estadios finales del cuadro el diafragma también se ve afectado, lo que conduce a un fallo respiratorio que lleva a la muerte del paciente. Otro factor de morbi-mortalidad importante es la afectación de las motoneuronas bulbares; pues produce fasciculaciones de la lengua, mala succión, aumento del número de degluciones y dificultad para la alimentación que pueden desembocar en neumonías por aspiración. Por lo tanto, se podría decir que estos pacientes mueren a consecuencia de dos fenómenos que son: el fallo respiratorio y la neumonía por aspiración (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET).

Finalmente, hay que destacar que en los últimos años ha habido una creciente evidencia de que algunos de estos pacientes -generalmente los que se acompañan de una sola copia del *gen SMN2*- pueden tener defectos cardíacos como malformaciones cardíacas congénitas o defectos en los septos auricular y ventricular que pueden acarrear arritmias graves o incluso la muerte súbita (OMIM gen #253300).

AME Tipo II. se corresponde con un estadio intermedio. Típicamente, los pacientes muestran signos de afectación entre los 7 y los 18 meses de edad. Son sujetos capaces de sentarse sin apoyo y algunos, incluso, pueden adquirir la capacidad de ponerse de pie, pero no son capaces de caminar de forma independiente. Igualmente, los reflejos tendinosos profundos están abolidos.

Clínicamente, los pacientes más afectados presentan en los primeros años de vida contracturas articulares y cifoescoliosis debidas a la hipotonía y la debilidad muscular. En estos pacientes las motoneuronas bulbares no están tan comprometidas como en el tipo anterior, de forma que la deglución no se ve alterada, sino que se manifiesta en forma de afectación de la masticación. (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET). Por lo tanto, en estos casos no se considera un factor de riesgo de muerte la neumonía por aspiración, sino que su principal causa de muerte es el fallo respiratorio mediado por la hipotonía y atrofia de los músculos intercostales y, finalmente, del diafragma (OMIM gen #255500).

Para terminar, igual que ocurría en el tipo anterior, dentro de los pacientes con AME Tipo II existe un espectro de severidad que va desde niños débiles que son incapaces de sentarse sin apoyo y más propensos a la afectación respiratoria y la escoliosis temprana hasta niños relativamente independientes con una musculatura del tronco, las extremidades y las vías respiratorias mejor desarrollada (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET). Esta diferencia en el espectro se traduce en una variación de la esperanza de vida que establece un abanico entre los dos años y la adolescencia tardía (OMIM gen #255500).

AME Tipo III, AME juvenil o Enfermedad de Kugelberg y Welander. En esta categoría se incluyen pacientes que comienzan a desarrollar la sintomatología propia de su enfermedad pasados los 2 años (Tisdale and Pellizzoni, 2015). Son individuos clínicamente heterogéneos que, por lo general, alcanzan los hitos motores principales como la marcha independiente, a pesar de que durante la infancia presentan debilidad muscular proximal y los signos de atrofia característicos de la AME (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET).

Retomando la idea de que la AME es una enfermedad de espectros, dentro de los pacientes con AME Tipo III algunos pueden necesitar asistencia mediante silla de ruedas en la infancia, mientras que otros pueden seguir caminando y vivir la vida adulta con una debilidad muscular menor (D'Amico and Bertini et al., 2011 ORPHANET). Como cabría esperar, la afectación bulbar de estos pacientes es mucho menor que en los tipos anteriores de manera que la respiración y la deglución están prácticamente preservadas, así que su esperanza de vida depende fundamentalmente de su situación física y del progreso de su enfermedad a nivel motor, pero, en cualquier caso, son pacientes que sobreviven a la edad adulta.

AME tipo IV, AME de inicio adulto o pseudomiopática. Corresponde al estadio menos grave de la enfermedad, pues afecta a personas en la edad adulta y se manifiesta como un cuadro de debilidad muscular proximal presentando un patrón similar al hallado en otras miopatías. Un hecho importante acerca de estos pacientes es que su esperanza de vida es igual a la de la población general puesto que estos individuos no presentan de alteraciones respiratorias y nutricionales (Narcís et al., 2019; Tisdale and Pellizzoni, 2015).

6. LA PROTEÍNA DE SUPERVIVENCIA DE LAS MOTONEURONAS (SMN)

Como se comentó en la introducción, la SMN es una proteína ubicua y fundamental en numerosos procesos de la homeostasis del organismo como i) la biogénesis de snRNPs espliceosomales, ii) el ensamblaje de cuerpos nucleares de Cajal ("Cajal bodies", CBs), iii) el tráfico axonal de determinados mRNAs, iv) la traducción de mRNAs, v) la dinámica del citoesqueleto de actina y vi) los procesos de endocitosis y autofagia (Chaytow and Huang et al., 2018).

6.1 Estructura molecular de SMN

Para poder explicar con detenimiento las funciones de SMN es preciso, en primer lugar, detallar su estructura molecular, puesto que determina las interacciones moleculares de la proteína y con ello los procesos en los que participa. Para esto, se describirán los dominios que presenta desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

La SMN humana completa es una proteína de 38 kDa formada por 294 aminoácidos, que se transcribe a partir del gen telomérico *SMN1* localizado en el cromosoma 5q13. Este gen está compuesto por 9 exones (1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) que codifican una proteína con cuatro dominios estructurales (Chaytow and Huang et al., 2018). En primer lugar, cuenta con un dominio rico en lisinas que está codificado por el exón 2, este dominio tiene como función principal la interacción con la proteína Gemin2 -componente del complejo SMN localizado en el citoplasma y en CBs y GEMS del núcleo- y con el RNA tanto *in vitro* como *in vivo*. (Chaytow and Huang et al., 2018).

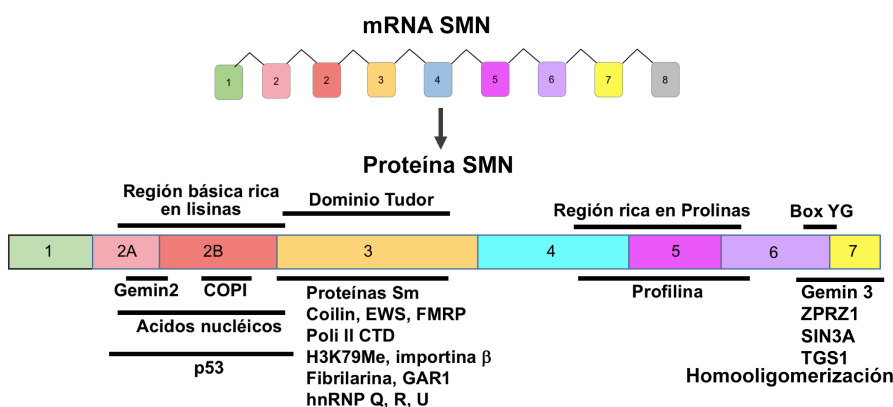


Figura 3. Diagrama de los dominios de interacción molecular de SMN con moléculas dianas. Tomado de Narcís et al., 2019 y basado en Singh et al., 20017.

Respecto a los GEMS y CBs, en 1996, Liu y Dreyfuss describieron la localización de SMN en unos cuerpos nucleares, denominados GEMS o *Géminis de CBs*, de 0.1-1 μ m en diámetro, compuestos por proteínas del complejo SMN y carentes de coilina, cuya función es desconocida. Por su parte, los CBs son estructuras mucho más complejas que además de concentrar coilina y SMN, contienen otros compuestos como snRNPs espliceosomales y snoRNPs necesarios para el procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs, respectivamente (Chaytow and Huang et al., 2018; OMIM). La importancia de los CBs en la fisiopatología de la AME queda reflejada en la observación de que el déficit de SMN en esta enfermedad impide el ensamblaje de CBs y dramáticamente afecta al procesamiento de pre-mRNAs y a la traducción de los mRNAs maduros en las MNs (Zhang et al., 2008; Tapia et al., 2012, 2017; Machyna et al., 2013; Narcís et al., 2018).

En su porción central, SMN posee un dominio Tudor que corresponde a una región proteica muy conservada cuya función principal es la interacción proteína-proteína. Esta región se une a las argininas del extremo C-terminal y a las colas ricas en glicina de algunas proteínas espliceosomales del complejo Sm (de Smith). Tales

proteínas contienen residuos dimetilados simétricos de arginina que promueven su unión al dominio Tudor de la SMN y facilitan el ensamblaje de las snRNP espliceosomales (Matera and Wang, 2014; Chaytow and Huang et al., 2018). El dominio Tudor tiene también una región de interacción con SUMO, denominada SUMO-Interacting Motif (SIM), cuya función es imprescindible para la unión de SMN a las proteínas Sm y para el ensamblaje de los CBs. (Lafarga et al., 2014; Chaytow H, Huang Y-T et al. 2018). Asimismo, el dominio Tudor interacciona con la colina, un marcador fundamental de los CBs.

El dominio Tudor se continúa con una región rica en prolina, codificada por los exones 4-6 del gen *SMN*, imprescindible para la interacción con profilinas, proteínas clave para la regulación de la dinámica de los filamentos de actina (Chaytow and Huang et al., 2018). Finalmente, en el extremo C-terminal se presenta un último dominio, denominado caja YG (“YG Box”) con una *cremallera de glicinas* que resulta fundamental en la auto-oligomerización de SMN, proceso irremplazable tanto para la estabilidad y funcionalidad de la proteína como en el ensamblaje de snRNPs espliceosomales (Wang and Matera, 2014). Tal es su importancia, que se ha demostrado que aproximadamente el 50% de los casos de mutaciones sin sentido en pacientes con AME, se deben a mutaciones en la Caja YG pues resulta fundamental en la supervivencia de las MNs. Además, hay que destacar que en un gran porcentaje de estos casos el paciente desarrolla AME tipo I, fenotipo de mayor gravedad (Chaytow and Huang et al., 2018).

6.2. Función de la SMN en la biogénesis de snRNPS espliceosomales

Dentro de las funciones que lleva a cabo SMN la primera en ser identificada y estudiada fue su papel en el ensamblaje de snRNPs. Estas proteínas forman parte del espliceosoma, una maquinaria compleja que cataliza la escisión de los intrones y el empalme de los exones del pre-mRNA (Matera and Wang, 2014).

La biogénesis de las snRNPs comienza en el núcleo con la transcripción de una serie de moléculas de RNA nuclear pequeño (snRNAs) ricas en uridina denominadas U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4atac y U6atac (Tisdale and Pellizzoni, 2015; Chaytow and Huang et al., 2018). Posteriormente, estos snRNAs son exportados al citoplasma y aquí es donde entra en juego SMN (Carvalho et al., 1999). La proteína SMN no ejerce su función en solitario, sino que forma parte de un complejo macromolecular en el que se encuentra en posición central y es rodeada por ocho proteínas, 7 de la familia Gemin (Gemin 2-8) y la proteína Unrip. El complejo SMN actúa como chaperona permitiendo la unión de los snRNAs a las proteínas Sm. Los snRNAs citoplasmáticos (Battle et al., 2006; Yong et al., 2002) se unen de manera específica a Gemin 5, al mismo tiempo que Gemin 2 aporta el soporte estructural que permite realizar una unión ATP-dependiente entre los snRNAs y Sm “core” obteniendo un snRNP que, posteriormente, deberá ser importado al núcleo.

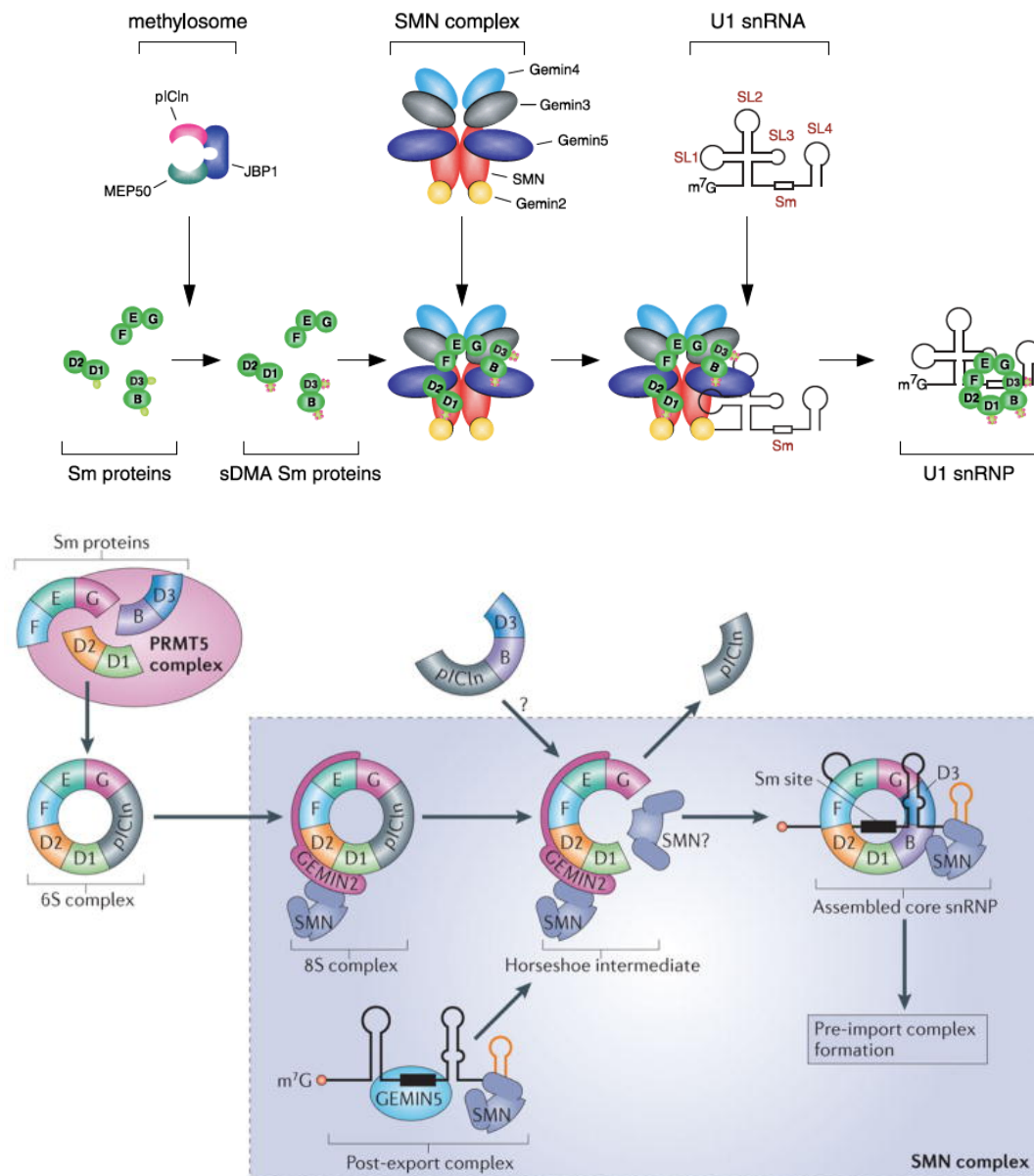


Figura 4. Esquema del ensamblaje de snRNPs por el complejo SMN.
Reproducido de Matera and Wang, 2014

El snRNA es hipermetilado en su extremo 3' por la trimetilguanosin sintetasa 1 (TGS1) formando una caperuza de trimetilguanosina ("TMG-cap") que, junto con el Sm "core", sirven como marcadores de importación nuclear. Para esta importación, las snRNPs se unen al complejo de importación nuclear formado por las proteínas "*snurportin*" y el receptor nuclear de importación, importina- β . En este proceso también interviene SMN a través de la interacción con la importina- β , un proceso facilitado por WRAP 53, proteína que también interviene en el tráfico de SMN a través de los CBs promoviendo la interacción entre SMN y la coilina. Por lo tanto, SMN interviene tanto en la biogénesis de las snRNPs en el citoplasma como en su importación al núcleo (Liu and Dreyfuss 1996, 1997).

El complejo SMN también está involucrado en la biogénesis de la U7 snRNP implicada en el procesamiento de los pre-mRNAs de las histonas (Marzluff et al., 2008). El ensamblaje de las snRNPs U7 es homólogo al del resto de snRNPs con una salvedad, en este caso, en lugar de unirse a las proteínas Sm se unen a dos proteínas U7-específicas (“Sm-like”) denominadas Lsm10 y Lsm11. Del mismo modo el complejo SMN actúa como chaperona permitiendo la unión entre U7 y las proteínas “Sm-like” que permite la biogénesis de U7 snRNPs y con ello el procesamiento específico del extremo 3’ de los pre-mRNAs de las histonas que son los únicos pre-mRNAs que no experimentan el “splicing” (Schumperli et al., 2004).

SMN interviene en otros procesos menos estudiados como el ensamblaje y metabolismo de complejos formados por RNPs, como las pequeñas RNPs nucleolares (snoRNPs) que intervienen en la modificación y procesamiento de los RNA ribosomales en el nucléolo. Una expresión defectuosa o nula de SMN induce la acumulación anormal de agregados de snoRNPs fuera del nucléolo. Así, en pacientes con AME se produce este fenómeno que se acompaña de un descenso de snoRNPs en los CBs, lo que se correlaciona con una mayor severidad de la enfermedad (Renvoise et al., 2009). La disfunción en la biogénesis de snoRNPs en la AME es consistente con las alteraciones nucleolares de la biogénesis de rRNAs observadas en MNs de pacientes de AME y del modelo murino SMN Δ 7 de la enfermedad (Tapia et al., 2012, 2017). Para terminar, existe un componente RNP de la telomerasa (TER, “telomerase RNA”), que pertenece al grupo de las snoRNPs, cuya función consiste en aportar un molde de RNA para la síntesis del DNA telomérico mediante la intervención de una transcriptasa inversa (sintetiza DNA a partir del molde de RNA). La actividad coordinada de estos dos componentes de la telomerasa (TER y transcriptasa inversa) es necesaria para el alargamiento del DNA telomérico (secuencias repetidas de un hexanucleótido) que se produce en las células troncales de la línea germinal que poseen una actividad ilimitada de replicación. El alargamiento telomérico compensa la pérdida de secuencias teloméricas que se produce en cada ronda de división celular y es esencial para mantener la estabilidad de los cromosomas.

Por lo tanto, SMN tiene un papel central en el ensamblaje de las RNPs y en el *splicing* de los mRNAs que son los procesos que determinan una síntesis proteica correcta. En este punto, se plantea una cuestión: si la deficiencia de SMN produce la alteración del *splicing* por qué en los individuos con AME no se ven afectados todos los tipos celulares, si en todas las células se lleva a cabo el proceso de corte de los intrones y empalme de los exones (“splicing”) del pre-mRNA. La respuesta podría encontrarse en que se ha demostrado que la reducción en la síntesis de SMN no afecta a todos los snRNPs por igual, sino que afecta preferentemente a U4atac / U6atac, U5 y U11 que son los componentes del espliceosoma menor U12, cuya función es el “splicing” de una proporción muy pequeña pre-mRNAs, pero de gran importancia para la homeostasis de las MNs (Lotti, 2012). Por otro lado, se ha observado que cuando se afectan snRNPs del espliceosoma mayor se ve afectado en mayor medida el *splicing* de genes neuronales lo que hace a las MNs especialmente vulnerables (Zang, 2013).

6.3. Participación de la SMN en el ensamblaje molecular de los cuerpos nucleares de Cajal (“Cajal Bodies”, CBs)

Los CBs son estructuras nucleares descubiertas por Cajal en las neuronas de los mamíferos (Cajal, 1903; Lafarga et al. 2009, 2017). Presentan numerosos componentes moleculares entre ellos coilina, SMN, fibrilarina nucleolar, snRNPs y snoRNPs, todos ellos relacionados con el procesamiento de pre-rRNAs y pre-mRNAs. Además, contiene también unas moléculas de RNA de pequeño tamaño propias de los CBs (scaRNAs) (Matera and Wang, 2014). Su composición, hace de los CBs estructuras nucleares dependientes de transcripción, de manera que el número de CBs que presenta una célula se relaciona directamente con su actividad transcripcional y, por tanto, con la demanda celular de procesamiento de pre-mRNAs y pre-rRNAs (Cioce et al., 1006; Lafarga et al., 1991; Lafarga et al., 2017).

Como se ha visto en el apartado anterior, SMN interacciona con las proteínas Gemin 2-8 y con la proteína Unrip para formar el complejo SMN que es esencial para la síntesis de snRNPs. Así, se ha comprobado que en el núcleo el complejo SMN se localiza en los CBs, como parte de los snRNPs, y formando parte también de los GEMS. En 2017, Tapia et al., realizaron un estudio en un modelo murino de AME en cuyas conclusiones se postuló que la reducción de SMN en las MNs implicaba la pérdida de las interacciones entre los CBs y el nucleolo, así como la disminución de los CBs canónicos, aquellos que contienen las moléculas esenciales para su correcto funcionamiento. Otro hallazgo importante fue la redistribución de las moléculas de coilina. En lugar de concentrarse en el CB y distribuirse de manera difusa por el nucleoplasma, la coilina se relocizaba alrededor del nucleolo, formando “rosetas” perinucleolares desprovistas de SMN y snRNPs, y dentro del nucleolo. Esta respuesta neuronal se acompañaba de una reorganización severa de los componentes nucleolares y la retención de algunas proteínas conjugadas con SUMO1 en cuerpos intranucleolares. En conjunto, estos resultados reflejan una severa disfunción de la maquinaria espliceosomal de biogénesis de snRNPs, además de la alteración del procesamiento de los rRNA dependiente de snoRNPs. Por lo tanto, la disfunción de los CBs en las MNs de los sujetos con AME sugiere que SMN tiene un papel esencial no solo en la organización de la maquinaria del *splicing* de los mRNAs sino también en la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas (Tapia et al., 2017).

6.4. Función de la SMN en el transporte axonal de mRNAs

Gracias a la investigación con microscopía confocal y electrónica en ratones control se ha podido visualizar SMN en dendritas y axones de las MNs de los cordones espinales (Pagliardini et al., 2000). Además, se ha comprobado que la localización de SMN varía en función del grado de maduración de las neuronas, de manera que durante el desarrollo neuronal es fundamentalmente nuclear, mientras que en las neuronas maduras SMN es mayormente citoplasmática y axonal (Giavazzi et al., 2006). Finalmente, hay que destacar que SMN también se encuentra en los conos de crecimiento de MNs cultivadas y que la visualización *en vivo* de las neuronas ha permitido observar un movimiento de SMN bidireccional a lo largo del axón.

La presencia de SMN en los axones y dendritas de las MNs podría estar en relación con funciones ya conocidas como el splicing. Sin embargo, se ha comprobado que, aunque SMN se localiza junto a proteínas del complejo SMN, como Gemin2, existe un déficit de proteínas Sm en las neuritas distales y en los gránulos axonales en los que se encuentra SMN (Zhang et al., 2003). Además, se ha identificado una nueva proteína, denominada neurocondrina, que es imprescindible para la localización de SMN en el citoplasma, y en las MNs se ha visto que la neurocondrina no colocaliza con snRNPs. Por lo tanto, la falta de proteínas Sm y la ausencia de colocalización entre la neurocondrina, SMN y snRNPs indican que en los axones y las dendritas de las MNs SMN lleva a cabo funciones diferentes al “splicing” de pre-mRNAs (Thompson et al., 2018).

La relación entre SMN y el tráfico intracelular de sustancias se puede explicar a través del sistema COPI, este es un entramado de vesículas derivado del complejo de Golgi, implicado en el tráfico de vesículas necesario para la maduración y crecimiento neuronal. SMN se une a la subunidad α -COP del sistema COPI y se ha comprobado que la depleción de α -COP altera la localización de SMN en los conos de crecimiento, produciendo su acumulación en la cara trans del aparato de Golgi. Por otro lado, α -COP es esencial para la formación de neuronas corticales primarias y MNs en modelos murinos (NSC-34 cells) y α -COP junto con SMN son necesarias para el crecimiento neuronal (Ting et al., 2012; Li et al., 2015; Custer et al., 2013). Colectivamente, estos hallazgos apoyan la idea de que SMN tiene un papel fundamental en el tráfico intracelular de vesículas necesario para la maduración neuronal, crecimiento axonal y establecimiento de la sinapsis neuromuscular.

También es conocida la interacción de SMN con la RNP nuclear heterogénea R (hnRNP-R). Esta proteína se asocia al pre-mRNA en el núcleo y parece influir en su procesamiento y posterior exportación al citoplasma de los mRNAs maduros. En este sentido, Rossol y su grupo de investigación (2003) demostraron la colocalización de SMN y hnRNP-R en el citoplasma de MNs cultivadas y observaron cómo en ratones con un déficit de SMN existía una reducción significativa del mRNA de la β -actina en los axones y conos de crecimiento que afectaba al crecimiento axonal y a la formación de las sinapsis. Los autores proponen que el déficit en la expresión de SMN interfiere con la exportación nuclear de mRNAs maduros debido a la falta de asociación entre SMN y hnRNP-R. En los ratones con AME, es también destacable que la alteración en el transporte axonal de mRNAs no solo afecta a la β -actina, sino que existía una reducción del 50% de los transcritos de mRNA que deben traducirse en los conos de crecimiento (Rossol et al., 2003).

Finalmente, SMN se relaciona con otras proteínas de unión al RNA (RBPs) actuando como chaperona. Por un lado, en la unión entre las RBPs y los mRNAs, y por otro, en la unión entre las RBPs y el citoesqueleto, lo que indirectamente implica que SMN determina la localización de los transcritos de mRNA. Por ejemplo, es conocida la interacción entre SMN y IMP1, FMRP, FUS o HuD, esta última es una RBP que se expresa solamente en las neuronas e interacciona con el mRNA, aumentando la tasa de transcripción e impulsando el crecimiento neuronal y con ello el desarrollo cerebral y la plasticidad (Fallini et al., 2011; Fallini et al., 2014). Así, en modelos de pez zebra con una delección de SMN se ha observado una disminución de HuD provoca el acortamiento de los axones, así como la limitación del desarrollo neuronal.

6.5. SMN y traducción

En el apartado anterior, se ha expuesto el papel de SMN en el tráfico de mRNAs a lo largo de los axones y las dendritas. El transporte de estos transcritos a través de la neurona permite llevar a cabo un proceso de traducción en localizaciones distales, que facilita el recambio de proteínas a nivel local ante estímulos como, por ejemplo, el aumento de actividad neuronal (Glock et al., 2017). Este proceso es fundamental para un desarrollo neuronal correcto, de hecho, la desregulación de la traducción local de proteínas se asocia a enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Donlin-Asp et al., 2017). Por lo tanto, SMN no actúa solamente facilitando la localización correcta de los mRNAs, sino que interviene directamente en la traducción de proteínas a nivel local. Además, el transporte de mRNAs y la traducción local están relacionadas estrechamente, pues recientes investigaciones han demostrado que en ratones con el gen *SMN* suprimido existía una desregulación en la traducción a nivel local que se podía revertir con una sobreexpresión de determinadas RBPs tales como HuD o IMP1 (Fallini et al., 2016). Por otro lado, el ultrafraccionamiento de extractos celulares de MNs ha revelado la asociación de SMN con los polirribosomas, lo que supondría una implicación directa de SMN sobre la traducción (Bernabo et al., 2017).

Por otro lado, SMN influye en la traducción de proteínas a través de microRNAs como miR-183, miR-96 o miR-182 que son microRNAs que se transcriben en “cluster” y están asociados con un aumento de la proliferación celular a través de la vía mTOR. Esta vía actúa como serina/treonina proteína quinasa regulando el crecimiento, la proliferación o la supervivencia celular. Así, aquellas neuronas que presentaban una reducción del 50% de SMN mostraban un aumento de la expresión de miR-183 en las dendritas, pero no en el soma neuronal, junto con una disminución de la funcionalidad de las proteínas de la vía mTOR (Kye et al., 2014). Este efecto fue confirmado en un ensayo con ratones Taiwaneses, en el que los fibroblastos de ratones con AME presentaban una disminución de la síntesis proteica, mientras que los fibroblastos de ratones con AME en los que se había inhibido la función de miR-183 recuperaban parcialmente la síntesis proteica (Kye et al., 2014).

La relación entre SMN y la vía mTOR ha sido estudiada también a través de la vía PTEN que constituye un regulador negativo de la vía mTOR. De forma que la disminución de SMN en las MNs produce un crecimiento axonal anómalo que da lugar a un fenotipo de AME. Así, si en estos ratones se induce una disfunción de la vía PTEN, se activa indirectamente la vía mTOR promoviendo la proliferación y supervivencia celular recuperándose clínicamente (Kye et al., 2014).

En definitiva, SMN tiene un papel crucial en la regulación de la traducción proteica a través de diferentes mecanismos. En primer lugar, es fundamental en la localización de mRNAs en el axón, en segundo lugar, en la disponibilidad de unidades ribosomales para la traducción a nivel local y, en tercer lugar, a través de la vía mTOR. Estas funciones posicionan a SMN en un papel central en relación con el control del crecimiento y la maduración de las MNs. Por este motivo, las MNs son especialmente sensibles a la pérdida de SMN y sufren alteraciones en su desarrollo antes que otros tipos celulares (Chaytow and Huang et al., 2018).

6.6. Contribución de la SMN a la dinámica del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto es una estructura crucial tanto para el mantenimiento de la arquitectura celular, como para la señalización y el transporte de moléculas en el interior de la neurona. El transporte de vesículas a través del citoesqueleto desde el soma hasta los axones y dendritas permite la formación de conos de crecimiento durante el desarrollo neuronal. Así, los defectos en el citoesqueleto se relacionan con numerosas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la AME (Leterrier et al., 2017).

Como se ha descrito en apartados anteriores, SMN se localiza en las dendritas y los conos de crecimiento y, además, modula la localización de β -actina dentro de estos, lo que permitiría plantear la hipótesis de que SMN tiene un papel en la regulación de la dinámica del citoesqueleto, y, particularmente, en la dinámica de la actina. Esta teoría se ha podido comprobar a través de estudios en el pez cebra en los que se ha descrito que los peces con un déficit de SMN presentaban una disfunción en la extensión de prolongaciones y crecimiento neural. Además, la sobreexpresión de SMN en cultivos de neuronas con un déficit de SMN permitía rescatar la normalidad del crecimiento neuronal. Por lo tanto, SMN tendría un papel crítico en el metabolismo de los microfilamentos independiente de la biogénesis de snRNPs (van Bergeijk et al., 2007).

Por otro lado, se ha comprobado que durante el crecimiento de las neuritas y la formación de GEMS nucleares SMN colocaliza con la Profilina 2a. SMN se une a través de sus residuos de prolina a la Profilina 2a regulando su actividad. La Profilina 2a es una proteína de unión a la actina, expresada fundamentalmente en el sistema nervioso, que contribuye a regular la dinámica de la actina promoviendo su polimerización. Además, la Profilina 2a es una diana de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK) que también modula la dinámica de la actina (Schmandke and Strittmatter, 2007). De este modo, una disminución de SMN en las MNs de cultivo, resulta en un aumento de Profilina 2a libre; por un lado, por un mecanismo de regulación positiva y, por otro, por un aumento de su disponibilidad al disminuir la proporción de Profilina2 unida a SMN. Así, el aumento de Profilina 2a induce la activación de la vía ROCK que promueve la desestabilización de los microtúbulos y la despolimerización del citoesqueleto de actina. Dando a este concepto un enfoque clínico, se ha observado que la inhibición de la vía ROCK en ratones con AME se traduce en un incremento de su esperanza de vida y la mejoría de la clínica muscular (Bowerman et al., 2007).

Otra molécula relevante es la PlexinaD1, se trata de una proteína que actúa como receptor y señalizador del crecimiento neuronal. De manera que se ha demostrado que la pérdida de SMN resulta en una desregulación del citoesqueleto de actina mediado por la inhibición de la PlexinaD1. Estudios en ratones Taiwaneses demuestran que los individuos con AME sufren una escisión de la PlexinaD1 por metaloproteasas que resulta en un cambio de función, de forma que la PlexinaD1 pasa de actuar como señalizador a actuar como inhibidor de la señalización contribuyendo al colapso de los conos de crecimiento. Además, en estos casos se vio que los residuos de actina junto con la PlexinaD1 formaban agregados patológicos en el interior de las neuronas, estos mismos agregados se observan en otras enfermedades neurodegenerativas (Rademacher et al., 2017).

Es importante destacar que en relación con la dinámica de la actina y a través del estudio de familiares con los mismos alelos de los genes *SMN1* y *SMN2*, pero una clínica discordante, se ha descubierto el primer factor modificador genético que actúa como protector de la AME. Este factor es la Plastina 3 (PLS3) que está implicada en la formación de nuevos axones a través del agrupamiento de residuos de F-actina. Así, la sobreexpresión de PLS3 en peces cebra carentes de SMN permite reestablecer el crecimiento axonal y restaurar los defectos de la AME aumentando la esperanza de vida del animal (Oprea et al., 2018).

Finalmente, existen otros roles de SMN relacionados con la regulación de la formación de los microtúbulos necesarios para el transporte de mRNAs, organelas y proteínas desde el soma neuronal hacia la periferia celular. Como, por ejemplo, el papel de la Estatmina que es una proteína que promueve la despolarización de los microtúbulos y la deficiencia de SMN resulta en un aumento de esta y, por consiguiente, la desestabilización de los microtúbulos neuronales (Wen et al., 2010).

6.7. SMN y la vía de endocitosis-autofagia

La endocitosis fue definida en 1936 por Christian de Duve (Cooper, 2017) como el proceso mediante el cual las células eucariotas son capaces de captar macromoléculas y partículas del medio circundante a través de un mecanismo en el que una porción de la membrana plasmática rodea el material que se va a introducir en la célula y posteriormente se invagina para formar una vesícula que contiene el material ingerido.

En lo que se refiere al sistema nervioso, la endocitosis es un proceso importante en la señalización neuronal y el crecimiento del axón y las dendritas. Pero, es fundamental en la sinapsis -incluida en la unión neuromuscular (en lo sucesivo, NMJ) - ya que permitirá el reciclaje de las vesículas sinápticas, proceso imprescindible para desarrollar los ciclos de liberación y recaptación de neurotransmisores (Deinhardt and Schiavo, 2005).

En un estudio realizado sobre el *Caenorhabditis elegans* se ha demostrado que la disminución de SMN induce la disfunción del mecanismo de endocitosis, provocando cambios estructurales y funcionales que afectan fundamentalmente a la NMJ. Estas alteraciones se basaban en la reducción de las vesículas presinápticas y la aparición de unas cisternas elongadas sugestivas de una falta de maduración de las vesículas de endocitosis, lo que se traducía en un descenso de la actividad de la NMJ por un defectuoso sistema de reciclaje vesicular (Martínez-Hernández et al., 2013).

La importancia de SMN en la endocitosis ha sido estudiada también a través de la observación de dos procesos: primero, a través de la caracterización de las funciones de PLS3 (plastina 3). En el estudio realizado con el modelo Taiwanés de ratón AME se analizó la expresión de FMI-43, un marcador de vesículas de endocitosis, en el músculo esquelético demostrándose que había una reducción significativa de las vesículas, que podía revertirse con la sobreexpresión de PLS3 (Engqvist-Goldstein, 2003). Segundo, en otra línea de investigación se demostró que la proteína de unión a F-actina, coronina 1C (CORO1C) interacciona con PLS3 y su sobreexpresión también es capaz de revertir los

efectos en la endocitosis promovidos por la deficiencia de SMN e incluso mejorar el fenotipo de la enfermedad (Hosseini-barkooie et al., 2016).

Por otro lado, se ha descrito la importancia de SMN en la endocitosis a través del estudio de un regulador negativo tanto de la endocitosis como del crecimiento neuronal como es la proteína neuronal sensible al calcio neurocalcina delta (NCALD). Esta proteína se localiza en los conos de crecimiento y en las zonas presinápticas de la NMJ. Así, en ausencia de calcio intracelular, la NCALD interactúa con las moléculas de clatrina impidiendo que éstas formen las vesículas de endocitosis necesarias para el reciclaje de neurotransmisores en los terminales sinápticos. Por el contrario, cuando los niveles de calcio citosólico son elevados, los neurotransmisores desplazan NCALD liberando las moléculas de clatrina y permitiendo que formen las vesículas de endocitosis. La relación entre este proceso y SMN reside en que se ha visto que bajos niveles de SMN inducen una disminución del flujo de calcio al interior de la neurona (Riessland et al., 2017).

En relación con la autofagia, hay que recordar que es un proceso catabólico, altamente conservado, utilizado por las células para degradar macromoléculas como agregados proteicos u organelas que ya no son requeridos para las funciones celulares (Kaur and Debnath, 2015). En su transcurso se pueden establecer dos etapas, una primera en la que una estructura con doble membrana, generalmente una cisterna del retículo endoplásmico es capaz de rodear complejos de macromoléculas y organelas marcadas con una señal de destino a la autofagia, dando lugar al autofagosoma. Y una segunda etapa en la que el autofagosoma se une a los lisosomas para formar el autolisosoma en el que se degradarán estos componentes. También hay que saber que la autofagia es un mecanismo balanceado en el que la disminución de la expresión de los genes relacionados con la autofagia promovería el acúmulo de proteínas no deseadas, del mismo modo que el aumento de los autofagosomas y la actividad autofágica podrían estar en relación con la muerte celular y, en ambos polos de la balanza se ha visto que tiene un papel relevante SMN (Mariño et al., 2014). Así, la caracterización del papel de SMN se ha llevado a cabo a través de distintos estudios, llegando a conclusiones, en algunos casos, contradictorias.

En primer lugar, se ha medido la expresión de LC3-II, un marcador molecular de autofagia, y se ha comprobado cómo existe un aumento del número de autofagosomas en las MNs con una disminución de SMN en los modelos murinos Taiwanes y SMN Δ 7 de AME (Custer and Androphy, 2014). En segundo lugar, se ha medido la autofagia a través de los niveles de p62/SQSTM1 -marcador del flujo autofágico-. Así, se comprobó que en ratones con AME y en la línea celular NSC-34 de MNs con bajos niveles de SMN había una sobreexpresión de p62 que indicaba la reducción del flujo autofágico. Es interesante tener en cuenta que este fenómeno no se observaba en los ratones SMN Δ 7 (Custer and Androphy, 2014). Finalmente, la inhibición de la proteólisis lisosomal con Bafilomicina A1 (BafA1) en ratones con AME produce la acumulación de LC3-II y aumento de los autofagolisosomas, sugiriendo la activación de la autofagia (Custer and Androphy, 2014).

Finalmente, del mismo modo que SMN actúa como factor regulador sobre la autofagia, se podría decir que los moduladores de la autofagia pueden variar los niveles de SMN. Así, la rampamicina que es un inhibidor mTORC1 que se cree que aumenta la

autofagia, produce un ascenso de los niveles de SMN. Del mismo modo, el aumento de BafA1 que, también activa la autofagia, podría disminuir los niveles de SMN (Periyakaruppiyah et al., 2016).

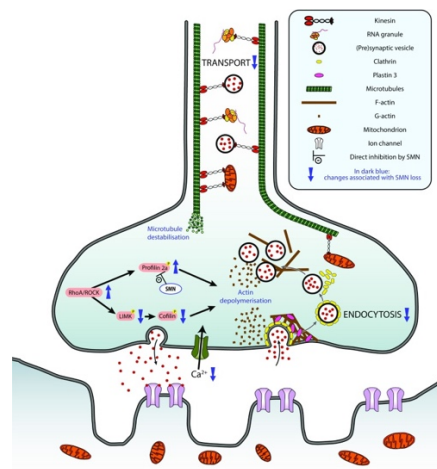


Figura 5. Representación esquemática de las alteraciones de la dinámica del citoesqueleto y la endocitosis ante la deficiencia de SMN. Tomado de Chaytow et al., 2018.

7. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MIOFIBRAS ESQUELÉTICAS (FMEs)

7.1 Introducción al músculo esquelético

Existen dos tipos de músculo estriado, el músculo estriado cardíaco y el músculo estriado esquelético. Mientras que el músculo cardíaco representa funcionalmente un conjunto de células musculares autoestimulantes y no fatigables con un requerimiento de energía intermedio, el músculo esquelético representa un conjunto de células musculares voluntarias inervadas que se fatigan ante altos requerimientos de energía (Mukund and Subramaniam, 2019). Analizando minuciosamente el músculo estriado esquelético se puede apreciar la alta complejidad en composición, estructura y función, que permiten llevar a cabo la contracción.

Es importante entender el músculo estriado esquelético como una gran estructura jerárquica en la que todos los elementos trabajan en una misma dirección, ya que la actividad coordinada y precisa de cada uno de los elementos es esencial para lograr un estado de salud muscular y su consiguiente actividad motora asociada. Por el contrario, cualquier perturbación de la coordinación tiene como resultado la pérdida de salud y función muscular dando lugar a una pérdida de miofibras que conlleva la debilidad muscular y, en algunos casos, la muerte (Mukund and Subramaniam, 2019).

La unidad estructural del músculo esquelético es la fibra muscular esquelética (FME), que está formada por un conjunto miofibrillas rodeadas de sarcoplasma y encerradas en una membrana celular o sarcolema. La visualización en secciones longitudinales de estas miofibrillas es la que le da el aspecto estriado característico al músculo (Welsch, 2009). Posteriormente, un conjunto de FME paralelas se agrupan formando un fascículo y, finalmente, el conjunto de los fascículos forma el tejido

muscular. En esta organización secuencial del músculo, existen también una serie de envolturas de tejido conjuntivo que rodean las distintas capas. De forma que las FME están rodeadas por fibras de colágeno tipo III (fibras de reticulina), además de algunas fibras de colágeno tipo I y de la matriz extracelular que, en conjunto, forman el endomisio. A su vez los fascículos están rodeados por un manguito de tejido conjuntivo proveniente del epimisio denominado perimisio y el músculo entero está envuelto por el epimisio que es una capa de tejido conectivo denso que limita hacia fuera con la fascia muscular (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

7.2. Estructura general de la FME

Durante el desarrollo embrionario la fusión de mioblastos mononucleados origina un miotubo multinucleado postmitótico que, en una segunda etapa, se diferenciará en una célula o fibra muscular de gran longitud (hasta varios centímetros) y de entre 10 y 100 μm de diámetro que constituirá la unidad funcional del músculo esquelético (Kierszenbaum, 2012).

Estas fibras están rodeadas por la lámina basal que incluye las células satélites, células troncales responsables de la regeneración muscular. Sobre la lámina basal inciden las terminaciones nerviosas de las fibras motoras que forman la unión neuromuscular o placa motora. El endomisio, en la proximidad de las FME, alberga una red muy desarrollada de capilares sanguíneos de la microcirculación. La membrana plasmática o sarcolema delimita el citoplasma o sarcoplasma de la FME (Mukund and Subramaniam, 2019; Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

Cada FME incluye un número variable de estructuras cilíndricas, formadas por miofilamentos, que discurren paralelas al eje longitudinal de la FME, las miofibrillas. Estas miofibrillas están rodeadas por mitocondrias y por el retículo sarcoplásmico que constituye un sistema de cisternas de retículo endoplásmico liso que almacena grandes cantidades de Ca^{2+} . Por otro lado, el sarcolema emite unas invaginaciones tubulares hacia el sarcoplasma, denominadas túbulos transversos o túbulos T, que se acoplan íntimamente al retículo sarcoplásmico de la FME. Así, en un corte transversal de la FME frecuentemente se observa el túbulo T rodeado de dos cisternas de retículo sarcoplásmico, una configuración denominada tríada. La asociación de los túbulos T al retículo sarcoplásmico permite organizar una maquinaria contráctil que transmita el potencial de acción desde el sarcolema a los sarcómeros (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

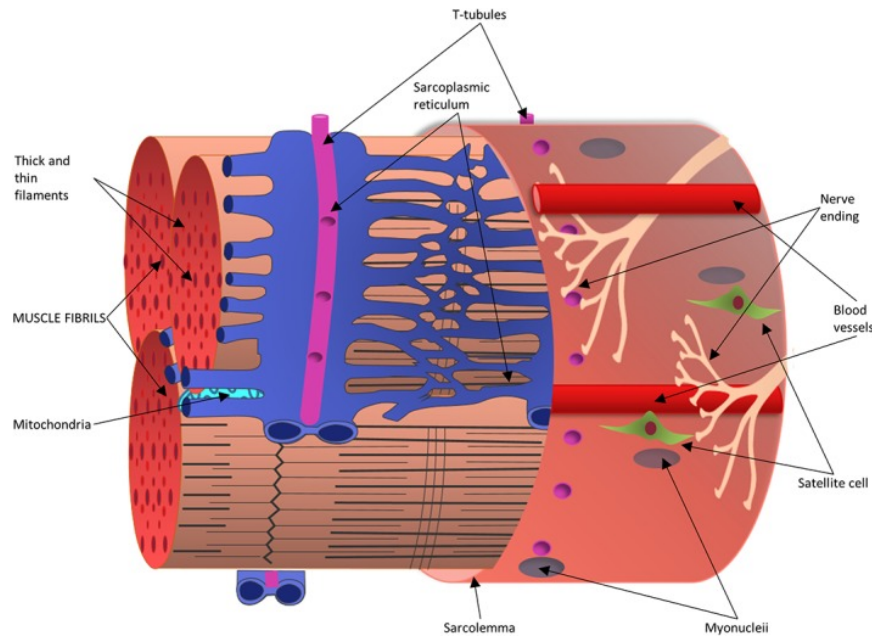


Figura 6. Representación esquemática de la fibra del músculo esquelético. Reproducido de Mukund and Subramaniam, 2019.

Las FME son células poliploides y multinucleadas de naturaleza sincitial, formadas por la fusión de los mioblastos. Pueden contener centenares de núcleos, denominados mionúcleos, de morfología oval y 8-10 μ m de longitud en el eje mayor, localizados en la periferia celular, debajo del sarcolemma, a lo largo de toda la longitud de la FME. La densidad nuclear en las FME humanas se ha estimado que oscila entre 20 y 40 núcleos por milímetro de longitud (Welsch, 2009).

Otro elemento esencial es el sarcoplasma que constituye el citoplasma de la FME. A diferencia de lo que ocurre en otros tipos de células, aproximadamente el 80% del sarcoplasma está ocupado por miofibrillas rodeadas de un gran número de mitocondrias, pues el requerimiento energético de las FME es muy elevado. De este modo, las mitocondrias se disponen en paralelo al eje de las miofibrillas y formando grandes agregados debajo del sarcolemma (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

7.3. La sarcómera como unidad estructural y funcional de contracción

Como se ha descrito en el apartado anterior, las fibras musculares están compuestas por decenas de miofibrillas que representan repeticiones de sarcómeros, la unidad contráctil básica del músculo estriado (Kierszenbaum, 2012). Los sarcómeros están formados por miofilamentos de actina y miosina que interaccionan entre sí para generar la fuerza de contracción. De este modo, la disposición de los miofilamentos finos (actina) y gruesos (miosina) es responsable del patrón en bandas que se observa al estudiar las FME al microscopio óptico y electrónico (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

Analizando la estructura microscópica de las sarcómeras se distinguen con relativa facilidad varias estructuras. En primer lugar, el **disco Z** -cuyo nombre proviene de la palabra alemana *zwischen* que significa intermedio- constituye un andamiaje transversal desde el que se extienden los filamentos finos de actina y que garantiza la transmisión mecánica eficiente de la fuerza de contracción (Mukund and Subramaniam, 2019; Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009). La parte de la miofibrilla que flanquea el disco Z presenta únicamente filamentos finos, de forma que al microscopio se ve como una región electrolúcida y se denomina **banda I**. En la parte más central de la sarcómera se ordenan los filamentos gruesos de miosina intercalados con los filamentos de actina, lo que al microscopio se traduce en una gran región de coloración oscura o electrodensa llamada **banda A** (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009). En el centro de la banda A se localiza la **banda H** o banda de Hensen que es una región de menor intensidad cromática en la que solamente se presentan filamentos de miosina. Esta banda tiene una peculiaridad y es que alberga la enzima creatina quinasa que es la responsable de catalizar la conversión de ADP en el ATP necesaria para ejercer la contracción. Finalmente, recorriendo la línea media de la banda H, se presenta la **línea M** donde se alinean las colas de las moléculas de miosina ensambladas lateralmente (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

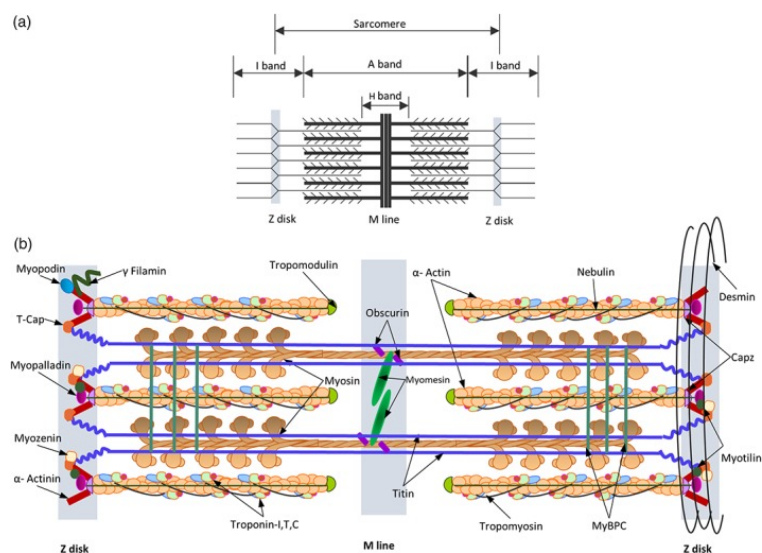


Figura 7. Representación esquemática un sarcómero. Reproducido de Mukund and Subramaniam, 2019.

7.4. Organización de los miofilamentos en la sarcómera

Los filamentos finos

Los filamentos finos se corresponden con hebras de actina F que, a su vez, están formadas por la unión de monómeros globulares o actina G. El ensamblaje de unidades de actina G se hace en disposición cabeza-cola confiriendo polaridad al filamento (Kierszenbaum, 2012). Además, los filamentos finos están asociados con una gran cantidad de proteínas que en conjunto forman parte esencial de la maquinaria de contracción (Mukund and Subramaniam, 2019). Entre ellas, hay que destacar la troponina (TNN) que constituye un complejo integrado a su vez por tres proteínas: i)

TNN-I, la subunidad inhibidora de la interacción entre la actina y la miosina, ii) TNN-C, la subunidad de unión al calcio y iii) TNN-T, el componente de unión a la tropomiosina. Otra proteína esencial es la tropomiosina formada por dos hélices α que se extienden sobre siete monómeros de actina, permitiéndolo estabilizar la actina. Además, la tropomiosina actúa como armazón molecular de la unión entre la subunidad TNN-C del complejo troponina y el filamento fino de actina (Mukund and Subramaniam, 2019; Kierszenbaum, 2012). Finalmente, la actina interacciona con la nebulina, que se extiende desde el disco Z hasta la banda H y sirve como molde molecular para determinar la longitud de los filamentos de actina (Mukund and Subramaniam, 2019; Kierszenbaum, 2012).

Los filamentos gruesos

La miosina es el principal componente de los filamentos gruesos. Esta proteína está formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas y cuatro cadenas ligeras, dos reguladoras y dos esenciales. Cada cadena pesada forma una cabeza globular desde la que se extiende una cola en forma de hélice α que permite el autoensamblaje de más moléculas formando un filamento de gran tamaño, las dos colas polipeptídicas se enrollan entre sí. Finalmente, en la región entre la cabeza globular y la cola polipeptídica -llamada cuello- se unen dos cadenas ligeras, una reguladora y otra esencial (Mukund and Subramaniam, 2019; Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009). En cuanto a su función, la miosina es simultáneamente una proteína estructural (cola) y una enzima con actividad ATPasa que hidroliza las moléculas de ATP para obtener la energía suficiente para la contracción (cabeza) (Mukund and Subramaniam, 2019).

Además, la miosina se asocia con otras proteínas, principalmente estructurales, como las proteínas de unión a la miosina (MyBP) C y H de la línea M. Las MyBPs contribuyen a la organización precisa de la miosina y regulan la generación de fuerza por el complejo de actomiosina y están en asociación con la titina (Freiburg and Gautel, 1996). Esta última, es una proteína elástica de gran tamaño que se extiende a lo largo de los filamentos gruesos hasta el disco Z, asegurando que se desarrollen fuerzas iguales en ambas mitades de la banda A. También se sugiere que la titina actúa como si se tratase de una regla, que determina la longitud precisa de la sarcómera y conforme a este parámetro organiza los filamentos de miosina regulando así la intensidad de la contracción sarcomérica (Wang and McClure, 1979).

Los discos Z

Los discos Z mantienen los filamentos de actina antiparalelos en una matriz regular y permiten conectar los sarcómeros repetidos en una matriz lineal formando las miofibrillas. Estas estructuras contienen una gran proporción de las proteínas sarcoméricas entre las que se incluyen desmina, titina, nebulina, miozeninas, miotilina, γ -filamina o γ -actina. Sin embargo, la más relevante es la α -actinina pues se trata de un componente estructural y funcional esencial para el sarcómero ya que media la inserción de los filamentos finos de actina al disco Z (Mukund and Subramaniam, 2019).

7.5. Bases moleculares de la contracción muscular

A nivel molecular, la contracción sarcomérica es un movimiento de las cabezas de miosina sobre los filamentos de actina de manera que se produce un acortamiento de la sarcómera del 20-30%. A este mecanismo conceptualmente se le denomina *Teoría del deslizamiento*. Durante este proceso, a pesar del acortamiento sarcomérico, la longitud de los filamentos permanece invariable. Así, los filamentos de actina se deslizan sobre los de miosina hasta llegar al centro de la sarcómera, pudiendo incluso superponerse a los filamentos de actina contralaterales. Del mismo modo, las cadenas de miosina se acercan hacia los discos Z. Este movimiento de deslizamiento de los filamentos produce una disminución del tamaño de la banda H y la banda I, mientras que la longitud de la banda A permanece invariable (Kierszenbaum, 2012; Welsch, 2009).

Para que se produzca la contracción muscular es necesaria la puesta en marcha de una serie de procesos tanto bioquímicos como mecánicos. En primer lugar, el impulso eléctrico que viaja por el axón de las MNs permite la liberación de acetilcolina a la unión neuromuscular como respuesta a un potencial de acción y, consecuentemente, produce una señal de excitación-contracción. Esta señal se propaga desde el sarcolema hacia los túbulos T de la tríada promoviendo la liberación citosólica de iones Ca^{2+} almacenados en el retículo sarcoplásmico (Kierszenbaum, 2012). De este modo, tras la despolarización aumenta la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol que se une a las subunidades de TNN-C generando la señal inicial para la contracción miofibrilar y generando cambios en las otras dos subunidades TNN-I y TNN-T. Los cambios producidos sobre la troponina alteran su interacción con la actina, liberando los sitios de unión para la miosina en los filamentos finos (Zot and Potter, 1987).

En este punto, la hidrólisis del ATP en ADP+Pi, dependiente de la actividad ATPasa de la miosina, permitirá la transformación de energía química en energía mecánica. Cuando el músculo está en reposo, las moléculas de ATP unidas a la cabeza de la miosina impiden que ésta se una a la actina. En cambio, en respuesta a la despolarización del sarcolema, los sitios de unión de la miosina a los filamentos finos se liberan y las moléculas de ATP unidas a la miosina son hidrolizadas en ADP+Pi (Welsch, 2009). En una segunda etapa, la liberación de los Pi libres, permiten la unión de la miosina a la actina mediada por una molécula de ADP. Posteriormente, la liberación de la molécula de ADP induce un movimiento de rotación de 45° en las cabezas de la miosina que permite una unión muy estable entre la actina y la miosina, que se corresponde con el estado de rigidez cadavérica. Este cambio de conformación de la miosina que provoca un movimiento de deslizamiento sobre la actina es también conocido como *golpe de fuerza*. Por último, al final del golpe de fuerza, la cabeza de miosina libera la molécula de ADP y la intercambia por una molécula de ATP volviendo a encontrarse a 90° respecto de la actina y recuperando así su estado de rigor (Welsch, 2009; Mukund and Subramaniam, 2019).

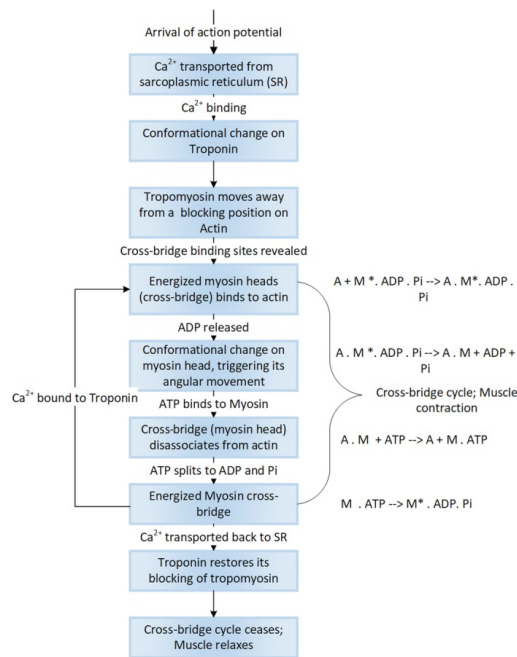


Figura 8. Eventos celulares subyacentes a la contracción muscular. Reproducido de Mukund and Subramaniam, 2019.

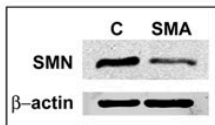
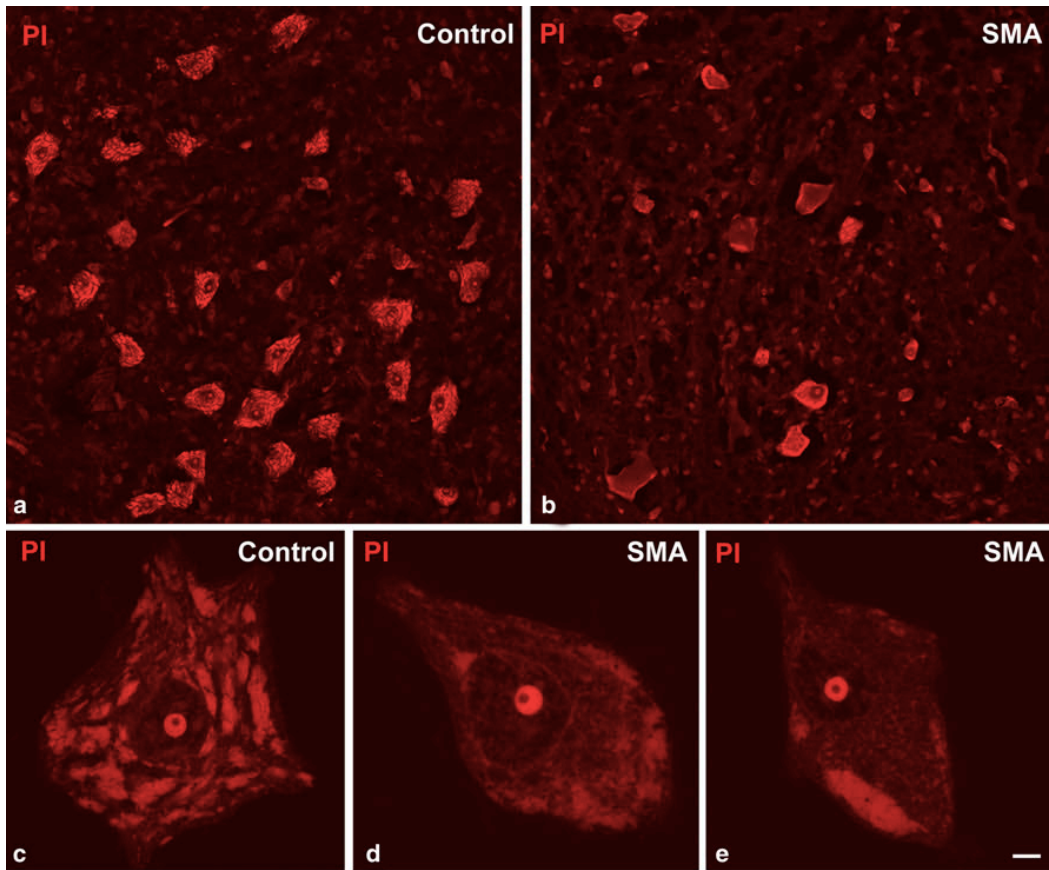
8. ALTERACIONES DE LAS MOTONEURONAS (MNs) EN LA AME

Las MNs del asta anterior de la médula espinal son la principal diana patogénica en la AME. Entre las alteraciones encontradas destacan los cambios nucleares y de la maquinaria citoplasmática de síntesis de proteínas cuya presencia repercute directamente sobre la funcionalidad neuronal. Atendiendo a los estudios realizados por Tapia *et al.* en 2012 y 2017 en pacientes de AME tipo se analizará i) el análisis histológico y cuantitativo de las MNs del asta anterior de la médula espinal, ii) la alteración de los CBs y la redistribución de la coilina, iii) la reorganización del nucleolo en las MNs SMN Δ 7, iv) alteraciones citoplasmáticas y v) señales de estrés celular.

8.1 Análisis histológico de las MNs del asta anterior de la médula espinal

En 2012 se realizó un estudio en el que se compararon muestras de tejido provenientes de un paciente con AME tipo I, cuyo genotipo revelaba la ausencia homocigota de los exones 7 y 8 del gen *SMN1* y únicamente dos copias del gen *SMN2*, con muestras de un paciente fallecido a los 3 meses de edad a causa de una neumonía (Tapia *et al.*, 2012). El análisis histológico de las MNs del asta anterior de la médula reveló una pérdida de MNs del 65% respecto al grupo control (Fig. 9 a, b). No solamente se observa una reducción en número, sino que la mayoría de las MNs restantes presentaban una disrupción severa de la maquinaria de síntesis proteica, un proceso conocido como cromatolisis, acompañada del desplazamiento del núcleo celular a la periferia de la MN.

Por el contrario, en las MNs del grupo control los cuerpos de Nissl -agregados de retículo endoplásmico rugoso (RER) que constituyen la maquinaria de síntesis proteica- presentan una distribución rigurosamente normal (Fig. 9 d, e). En particular, el $38.7 \pm 4.5\%$ de las MNs presentaba cromatolisis central y el $74 \pm 7.3\%$ mostraba excentricidad nuclear, mientras que en el grupo control no se detectaron ninguno de los dos fenómenos (Fig. 9, Tabla 1). La reducción de los niveles de SMN en la médula espinal del paciente con AME tipo I fue confirmada con Western blotting (Fig. 9 f) (Tapia et al., 2012).



f

Table 1. Percentage of control and SMA motor neurons with chromatolysis and eccentric nuclei

	No of motor neurons per $36 \times 10^4 \mu m^2$	% Motor neurons with chromatolysis	% Chromatolytic motor neurons with eccentric nuclei
Control	37 ± 5.41	-	-
SMA	$13 \pm 1.97^*$	38.7 ± 4.56	74.0 ± 7.31

n=100 motor neurons
Values are mean \pm SD
ANOVA $p < 0.001$. * $p < 0.001$ when compared to control

Table 2. Distribution of CBs and nucleoli with coilin in control and SMA motor neurons

	% Neurons with CBs coilin(+) & SMN(+)	large-size CBs/Neuron coilin(+) & SMN(+)	medium-size CBs/Neuron coilin(+) & SMN(+)	% Neurons with nucleolar coilin
Control	100	2.9 ± 0.18	11.0 ± 1.52	-
SMA	$40.6 \pm 8.66^*$	$0.6 \pm 0.14^*$	$1.2 \pm 0.58^*$	67.7 ± 6.67

n=100 motor neurons
Values are mean \pm SD
ANOVA $p < 0.001$. * $p < 0.001$ when compared to control

Figura 9. Alteraciones de las MNs espinales en un paciente AME tipo I. Disociado de MNs teñido con yoduro de propidio (PI) y análisis cuantitativo de la pérdida de MNs y de la respuesta de cromatolisis y excentricidad nuclear. El Western blot ilustra la reducción de los niveles de SMN en comparación con el individuo. Control. Reproducido de Tapia et al., 2012.

8.2 Alteración de los CBs y redistribución de la coilina

Tapia et al. (2012) demostraron en dobles marcajes para la coilina, un marcador de los CBs, y yoduro de propidio (PI) que únicamente el 40% de las MNs del paciente con AME tipo I presentaban CBs de gran tamaño, estructuras que si estaban presentes en la totalidad de las MNs control. Además, observaron que la colocalización de coilina y SMN, característica de los CB canónicos (funcionales), sólo aparecía en los CB de gran tamaño, mientras que la mayoría de los CBs medianos y mini-CBs ($91.7 \pm 7.5\%$, media \pm SD) carecían de SMN. Estos mini-CBs estaban formados por un material amorfo positivo para coilina, cuya aparición probablemente está en relación con la imposibilidad de formar CBs canónicos en las MNs de pacientes con AME por el déficit de SMN. Los autores proponen que la deficiencia de SMN actúa como factor limitante en el ensamblaje de los CBs, provocando un descenso del número de CBs canónicos que debe repercutir directamente sobre la eficiencia en el ensamblaje de snRNPs y, consecuentemente, en el splicing de pre-mRNAs (Tapia et al., 2012).

Para profundizar en el análisis de las alteraciones nucleares en las MNs los autores realizaron un estudio en un modelo murino de AME tipo I, el ratón SMN Δ 7 (Tapia et al., 2017). Así, demostraron que la reducción de CBs canónicos se acompaña de una redistribución de la coilina (Fig. 10 a, b) que se traduce en la formación de caperuzas perinucleolares de coilina, en el 87% de las MNs, mientras que el 10% presentaba una localización intranucleolar de la coilina (Fig. 10 i) (Tapia et al., 2017). En este mismo estudio, se realizó una co-tinción de coilina y SMN con el fin de comprobar si la disrupción de los CBs canónicos implicaba una pérdida de sus componentes esenciales como SMN. Los resultados demostraron que en las MNs de los ratones control SMN y coilina colocalizaban en los CBs además de mantener la típica distribución citoplasmática de SMN (Fig. 10 c-e). Sin embargo, SMN no estaba presente o se detectaba muy débilmente tanto en el citoplasma como en las caperuzas perinucleolares de coilina de las MNs de ratón SMN Δ 7 (Fig. 10 f-h). Por lo tanto, la desaparición de los CBs canónicos implica una redistribución de la coilina formando nuevas estructuras carentes de SMN. El estudio con RT-qPCR y Western blotting demostró que los ratones knockout para el gen murino *Smn* y con dos copias del gen humano *SMN2* presentaban una reducción severa de la concentración de mRNA y proteína SMN en las MNs en comparación con el grupo control. Curiosamente, a pesar de la reorganización de la coilina en los ratones SMN Δ 7 la concentración neta de esta proteína no mostraba diferencias entre el modelo con AME y el grupo control (Tapia et al., 2017).

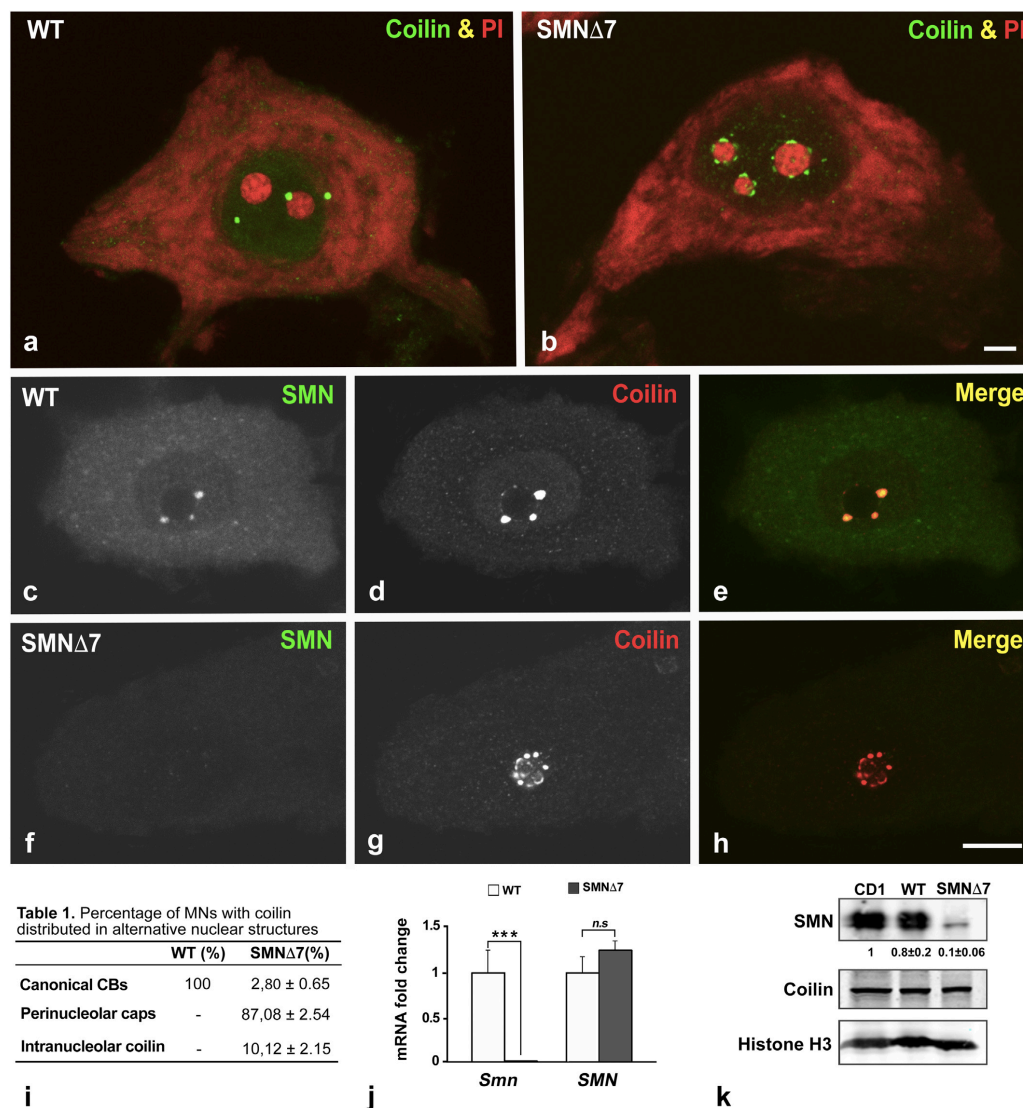


Figura 10. Hallazgos. Doble marcaje para coilina y IP (a, b) y coilina y SMN (c-h) en MNs control y SMN Δ 7. Análisis cuantitativo de la proporción de MNs portadoras de CBs canónicos. (j, k) Determinación por rt-qPCR y Western blotting de los niveles de SMN (mRNA y proteína) en ratones controles y AME. Reproducido de Tapia et al., 2017.

Dado que el estado de metilación de la coilina afecta al ensamblaje de los CBs (Boisvert et al., 2002), Tapia et al. (2017) se plantearon analizar si el estado de metilación de la coilina influía en su reorganización nuclear en MNs SMN Δ 7. Para ello utilizaron el anticuerpo monoclonal Y12, que reconoce la coilina dimetilada (Boisvert et al., 2002). Así, se demostró que en las MNs control la coilina estaba fuertemente dimetilada en los CBs, mientras que estaba hipometilada en las caperuzas perinucleares y en el nucleolo de las MNs SMN Δ 7. Los autores concluyen que la hipometilación de la coilina inducida por la reducción de los niveles de SMN podría afectar a la señalización nucleolar de la coilina y con ello al ensamblaje de los CBs canónicos en las MNs SMN Δ 7 (Tapia et al., 2017).

Desde el punto de vista funcional, se investigó cómo la reorganización de la coilina y SMN en los CBs de las MNs con AME podía afectar al reclutamiento de snRNPs espliceosomales hacia estos cuerpos nucleares. Para ello Tapia et al. en 2012 emplearon un doble inmunomarcaje para coilina y el complejo Sm de las snRNPs. En las MNs control se presentaba la colocalización típica de coilina y proteínas del complejo Sm en los CBs canónicos y los mini-CB. Por el contrario, en las MNs del paciente con AME únicamente los CBs de gran tamaño contenían coilina y proteínas Sm, mientras que los CBs de mediano tamaño y los mini-CBs no concentraban las proteínas relacionadas con los snRNPs (Tapia et al., 2012). Por lo tanto, la depleción de los CBs canónicos, la reorganización de la coilina y la alteración de otros componentes esenciales en la formación y función de los CBs como las proteínas Sm, estaría directamente relacionado con la alteración de la biogénesis de las snRNPs requeridas para el ensamblaje del espliceosoma, lo que desembocaría en la disfunción del *splicing* (Tapia et al., 2012, 2017). Por otro lado, la disminución de CBs canónicos en células cultivadas derivadas de pacientes con AME se ha asociado a una reducción del ensamblaje las snRNPs U4/U6-U5 que constituye un paso fundamental en la maduración de los componentes del espliceosoma. Además, la velocidad de ensamblaje de las snRNPs es, aproximadamente, 10 veces mayor en los CBs que en el nucleoplasma (Machyba et al., 2013; Novonty et al., 2011). Esto supone que la pérdida de CBs produce, por un lado, la reducción de la biosíntesis de los componentes del espliceosoma, la disminución en número del ensamblaje de estos y, al mismo tiempo, el enlentecimiento de este proceso cuando se tiene que dar en el citoplasma; lo que explicaría la afectación del *splicing* que se ve en los pacientes con AME.

En definitiva, los CBs de las MNs son una diana fisiopatológica de la AME, especialmente en el tipo I. La disfunción dependiente de los CBs de la biogénesis de snRNP y del *splicing* de pre-mRNA en estas MNs parece ser un componente esencial en la patogénesis de la AME. Incluso, la relocalización nucleolar de la coilina que acompaña la disrupción de los CBs es un marcador fiable de una disfunción neuronal severa en las MNs de la AME tipo I (Tapia et al., 2012)

8.3 Reorganización del nucleolo en las MNs SMN Δ 7

El nucleolo juega un papel fundamental en la biosíntesis de ribosomas. En las MNs de pacientes con AME la depleción de CBs provoca una alteración de la interacción entre los CBs y el nucleolo, interfiriendo en la organización nucleolar y con ello en la síntesis de ribosomas, lo que contribuye a la fisiopatología propia de la AME (Tapia et al., 2017). Para profundizar en la reorganización estructural, molecular y funcional del nucleolo en las MNs SMN Δ 7 Tapia et al. (2017) analizaron varios parámetros nucleolares. Se estudió la variación del tamaño nuclear, pues es un parámetro que se relaciona con la actividad de síntesis y procesamiento de pre-rRNA (Berciano et al., 2007; Lafarga et al., 1991). Así, el análisis morfométrico del diámetro nucleolar en MNs teñidas con IP reveló un aumento significativo del diámetro nucleolar en las MNs del ratón SMN Δ 7. La hipertrofia nucleolar fue muy relevante en fases avanzadas de la enfermedad, incluso en aquellas MNs con una abundante cromatolisis central (Tapia et al., 2017).

Otro aspecto estudiado fue la organización de los componentes nucleolares. En las neuronas de proyección, como son las MNs del asta anterior de la médula espinal, el nucleolo presenta una estructura reticular compuesta por centros fibrilares (FCs) de pequeño tamaño, rodeados por una envoltura de componente fibrilar denso (DFC), masas irregulares de componente granular (GC) e intersticio nucleolar (Riancho et al., 2014). El inmunomarcaje para la detección de UBF -que es un factor de transcripción de genes ribosomales y actúa como marcador de los FCs neuronales- y el análisis ultraestructural permitió analizar la reorganización de los componentes del nucleolo. Los nucléolos de las MNs SMN Δ 7 vistos al microscopio electrónico presentan una reorganización del ratio FC/DFC, mostrando un aumento del tamaño de los FCs junto con la desorganización del DFC y la aparición de masas irregulares de GC de gran tamaño (Fig. 11 b, c) (Tapia et al., 2017). Por otro lado, la inmunotinción con UBF reveló una reducción significativa tanto del número de FCs por núcleo como de la densidad de agrupación de los mismos, entendida ésta como el número de FCs/ μm^2 (Fig. 11 c, e, f). Además, esos cambios se acompañaron de otras alteraciones como la segregación de acúmulos de GC de gran tamaño y la formación de cavidades nucleolares que a menudo contenían cuerpos intranucleolares electrodensos (INoB) (Fig. 11 b-d) (Tapia et al., 2017).

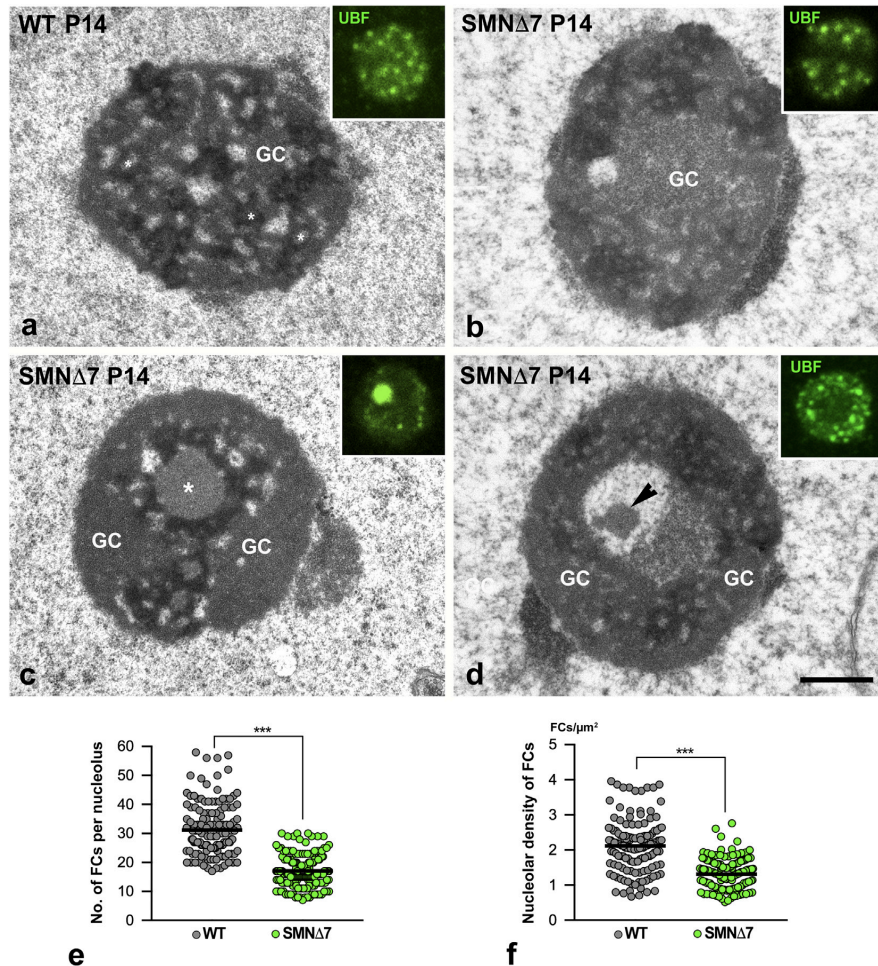


Figura 11. Alteraciones nucleolares en las motoneuronas del ratón AME. Mientras que el nucleolo control (a) presenta una estructura reticular con numerosos FCs, en la AME se produce pérdida de FCs, segregación del GC (b, c) y formación *de novo* de cuerpos intranucleolares de agregación de proteínas (d). (e, f) Análisis cuantitativo de la distribución de FCs en MNs control y AME.

Tomado de Tapia et al., 2017.

En relación con la actividad funcional del nucleolo tras la reorganización de sus componentes, se estudió el impacto de las alteraciones nucleolares en la transcripción de genes ribosomales, para ello se evaluó la transcripción a nivel ultraestructural mediante el marcaje de las moléculas de RNA nascente con 5'-fluorouridina (5'-FU). En las MNs de los modelos control, las partículas inmunomarcadas de 5'-FU se detectaban fundamentalmente en los DFC que actúan como sitios de transcripción de genes ribosomales, mientras que los FCs se presentaban libres de inmunomarcaje (Fig. 12 a, b). Curiosamente, en las MNs del modelo SMN Δ 7 la detección del 5'-FU se presentaba fundamentalmente en los DFC mientras que los FCs permanecían silentes, lo que traduce que la transcripción a nivel nucleolar se encuentra preservada en las MNs SMN Δ 7 (Tapia et al., 2017). Estos hallazgos no son suficientes para establecer la relación entre las alteraciones nucleolares y la síntesis y procesamiento de los pre-rRNA. Por ello se determinó el nivel de expresión de 45S pre-rRNA, precursores intermedios del 18S rRNA (43S, 34S y 29S) y 18S rRNA maduro. Los resultados reflejaron que no había diferencias significativas en la concentración de 45S y precursores intermedios, pero si existía un incremento de 18S rRNA maduro, lo que traduciría una retención de esta forma madura de rRNA en el nucleolo como consecuencia de las alteraciones estructurales y funcionales (Tapia et al., 2017). Este hallazgo unido a la formación de INOb, parece reflejar un mecanismo de retención de rRNAs y proteínas nucleares como consecuencia de las alteraciones nucleolares presentes en MNs SMN Δ 7 (Tapia et al., 2017). Por lo tanto, la organización de los CBs y del nucleolo se podría postular como un indicador fiable del estado neuronal ante situaciones de neurodegeneración. Del mismo modo, la estimulación de las funciones nucleolares y de los CBs podría ser una estrategia terapéutica para paliar la disfunción propia de las MNs degeneradas (Tapia et al., 2017).

8.4 Alteraciones citoplasmáticas de la maquinaria de síntesis proteica

Teniendo en cuenta que el nucléolo juega un papel fundamental en la biogénesis de los ribosomas, se planteó la posibilidad de que las alteraciones nucleolares observadas en las MNs SMN Δ 7 tuvieran una repercusión directa sobre la organización estructural de la maquinaria de síntesis proteica de las MNs (Tapia et al., 2017). Para ello se realizó en primer lugar una tinción de las MNs con hematoxilina-eosina y IP. De manera similar a lo observado en las MNs del paciente con AME tipo I (Tapia et al. 2012), las MNs del ratón AME mostraron una pérdida importante de grumos de Nissl (cromatolisis) y, en algunas neuronas, excentricidad nuclear, dos hallazgos característicos de la respuesta de las MNs espinales a la deficiencia de SMN (Tapia et al., 2017).

También se planteó el análisis ultraestructural de las MNs que permitió confirmar la típica disposición de las cisternas planas del RER ordenadas en el espacio y, entre ellas, numerosos polirribosomas libres en las MNs del ratón control. Por el contrario, las MNs del ratón SMN Δ 7 mostraban alteraciones del RER como la dilatación de las cisternas, que refleja el desbalance iónico, y la pérdida de ribosomas asociados a las membranas del RER. También se observa el desensamblaje de los polirribosomas en monorribosomas carentes de plantillas de mRNA que transcribir, lo que indica el bloqueo de la síntesis proteica (Lafarga et al., 1997; Baltanas et al., 2011). Por lo tanto, las alteraciones

nucleolares de las MNs del modelo murino SMN Δ 7 están directamente relacionadas con una afectación severa de la maquinaria de síntesis proteica (Tapia et al., 2017)

8.5 Señales de estrés celular y degeneración neuronal

La alteración y pérdida de los CBs está relacionada con multitud de señales de estrés celular (Cioce et al., 2006; Baltanas et al., 2011). Por este motivo, se analizó el comportamiento del activador 28 γ del proteasoma (PA28 γ) que es uno de los responsables de la disrupción de CBs en células cultivadas sometidas a radiación UV-C (Cioce et al., 2006). Así, mientras PA28 γ estaba distribuido de forma uniforme por el citoplasma y nucleoplasma de las MNs control (Fig. 12a-c), PA28 γ se localizaba junto a la coilina en los CBs y en el nucléolo de las MNs SMN Δ 7 (Fig. 12d-f). Estos hallazgos demuestran que los CBs de las MNs SMN Δ 7 tienen una activación mayor de uno de los componentes fundamentales del proteasoma, lo que podría explicar por qué vía se produce en la AME la degradación de algunos de los componentes esenciales de los CBs, por ejemplo, SMN. Además, la colocalización de PA28 γ y coilina del mismo modo que se produce en las células cultivadas sometidas a rayos UV-C se relaciona con la disrupción de los CBs, por lo tanto, aunque las funciones del *pool* de coilina de las MNs son desconocidas, su acumulación en el nucléolo parece ser un signo importante de neurodegeneración en la AME (Tapia et al., 2017).

Por otro lado, se investigó en qué medida están involucrados los cuerpos de proteína de la leucemia promielocítica (cuerpos PML) en la neurodegeneración causada por la reducción de SMN que ocurre en la AME. Los cuerpos PML son estructuras cuya aparición está vinculada al estrés celular y que se pueden encontrar en otras enfermedades neurodegenerativas (Villagrà et al., 2004). En las MNs del paciente control se podían encontrar numerosos cuerpos PML distribuidos por el núcleo y frecuentemente adyacentes a los CBs (Fig. 12 g-i). Por su parte, la neurodegeneración de las MNs del paciente AME tipo I se acompañaba de un incremento del número de cuerpos PML por neurona (7.83 ± 0.71 , en el control, vs 23.47 ± 1.88 , en el paciente AME tipo I) (Fig. 12 j-l). Así mismo, hay que destacar que la asociación espacial entre los cuerpos PML y los CBs, especialmente en relación con los mini-CBs, estaba preservada en las MNs del modelo AME (Fig. 12 l).

Teniendo en cuenta que la formación de cuerpos PML está inducida por la presencia de daño y estrés celular, se puede sugerir que su formación es un sensor dinámico de la integridad del DNA celular. Además de la proteína PML, otras proteínas implicadas en la reparación del DNA y componentes del proteasoma han sido localizadas en los cuerpos PML (Lafarga et al., 2002) lo que sugiere una relación entre los cuerpos PML y la degradación de proteínas por la vía proteasoma en las neuronas degeneradas (Cho and Dreyfuss, 2010). Por lo tanto, el aumento del número de cuerpos PML podría estar en relación con la activación de la vía ubiquitin-proteasoma, idea que iría en la misma línea que los hallazgos localizados en el estudio de PA28 γ por Tapia et al. (2012). Ambos resultados sugieren el aumento de degradación de proteínas inestables por el proteasoma, como podría ser la degradación de la forma mutante de SMN Δ 7, lo que explicaría la escasa vida media de esta proteína trucada que es la responsable de la

fisiopatología de la AME (Tapia et al., 2017). Finalmente, Kwon et al. (2011) realizaron un ensayo clínico donde administraban bortezomib, un inhibidor del proteasoma, en modelos murinos de AME, comprobando en varios tejidos cómo se producía un incremento del nivel de SMN y demostrando la participación del proteasoma en la regulación de los niveles de SMN.

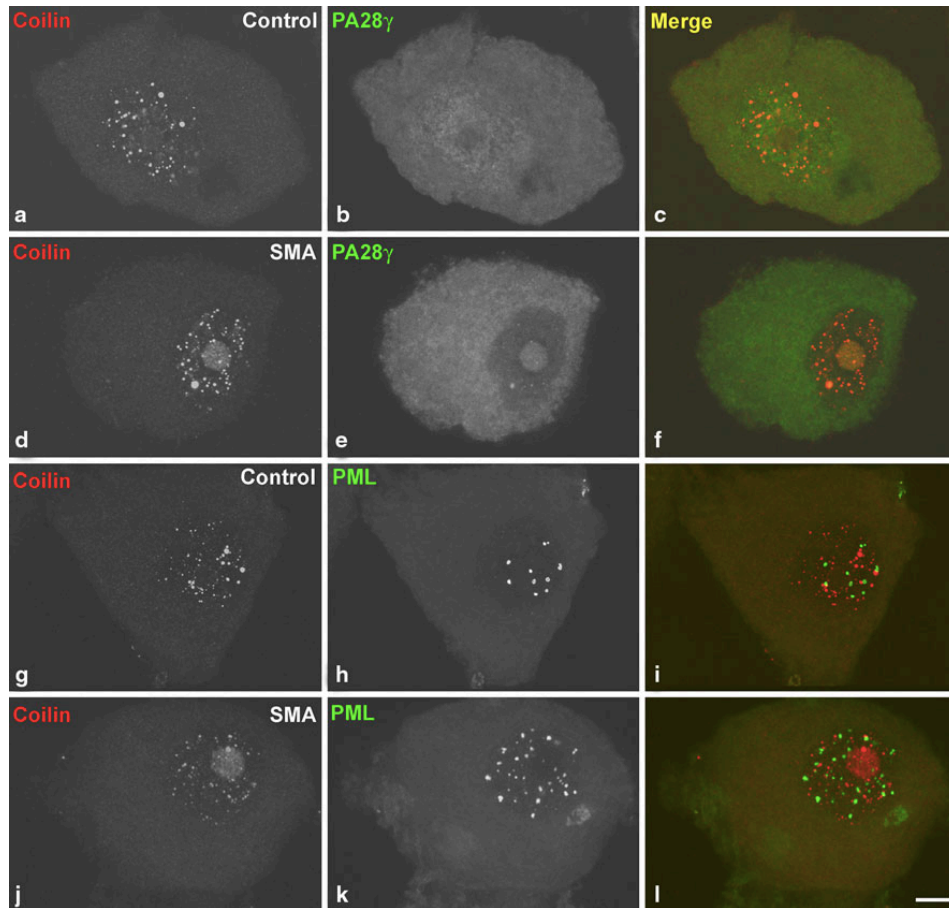


Figura 12. Doble inmunomarcaje para coilina y PA28γ y coilin and PML en MNs espinales humanas de un paciente control (a-c; g-i) y AME tipo I (d-f; j-l) ilustrando la presencia del proteasoma activador PA28γ en los CBs y la proliferación de PMLs en las MNs del paciente AME tipo I.

Tomado de Tapia et al., 2012.

9. ALTERACIONES DE LAS MIOFIBRAS ESQUELÉTICAS

La AME es una enfermedad en la que los pacientes presentan un cuadro de hipotonía severa con debilidad y parálisis muscular que frecuentemente conduce a la muerte en las formas más severas, como la tipo I. Por lo tanto, se puede afirmar que a pesar de que SMN es una proteína ubicua, hay una afectación preferente de las unidades motoras, MNs y las FME que inervan, que produce una miopatía. Tradicionalmente, se estipulaba que la degeneración de las MNs causaba una miopatía neurogénica como consecuencia de la denervación de las FME (para revisión, ver Dubowitz and Sewry, 2007). Sin embargo, en la actualidad se ha postulado que la denervación de las miofibras coexiste con una patología muscular intrínseca causada por el déficit de SMN en las FME (Walker et al., 2008; Berciano et al., 2020).

En este apartado se analizarán todas aquellas estrategias patogénicas que dan lugar a la miopatía atrófica de los pacientes con AME como son: i) el desarrollo de una miopatía neurogénica por la degeneración de las MNs, ii) la distribución sarcomérica de SMN en las FME, iii) las interacciones de SMN con otras proteínas sarcoméricas y iv) las alteraciones en las FME derivadas de la disminución de SMN.

9.1 Desarrollo de una miopatía neurogénica por la degeneración de las MNs

Existen numerosos estudios en relación con la miopatía neurogénica causada por la deficiencia de SMN en las MNs de pacientes con AME tipo I. La pérdida severa de MNs del asta anterior en la AME tipo I ha sido demostrada en varios estudios (para revisión, ver Dubowitz and Sewry, 2007). En el estudio realizado por el grupo de Lafarga en un paciente de AME tipo I se indica una pérdida de α -MNs de aproximadamente el 70% (Tapia et al., 2012; Berciano et al., 2020a). Además, las MNs no mostraban únicamente una reducción en número, sino que frecuentemente mostraban alteraciones estructurales. Así, las criosecciones transversales del asta anterior de la médula espinal teñidas con yoduro de propidio de la muestra control, reflejaban la abundancia de MNs de gran tamaño y desarrollo de la maquinaria de síntesis proteica, los grumos de Nissl. Por el contrario, las muestras del paciente AME tipo I revelaban una severa reducción del número y tamaño de las MNs, así como la disolución de la maquinaria de síntesis proteica, particularmente en la porción central del soma neuronal, un fenómeno conocido como “cromatolisis central” (Fig. 13 a, b) (Berciano et al., 2020a).

Por otro lado, a lo largo de la historia se ha ido estudiando la morfología de las FME en pacientes con AME tipo I. Dubowitz y Sewry (2007), en su libro sobre las miopatías, concluyen que los pacientes con AME tipo I presentaban simultáneamente agrupaciones de fibras musculares atróficas y grupos mixtos con fibras musculares hipertróficas y atróficas. Así, las agrupaciones de FME muy atróficas resultan de la denervación producida por la degeneración de las MNs espinales y constituyen la base celular de la miopatía neurogénica propiamente dicha. Y, al mismo tiempo, aparecen grupos mixtos que combinan la presencia de fibras atróficas y fibras hipertróficas, estas últimas producidas como consecuencia de la poli-inervación compensatoria de las FME de unidades motoras cuyas MNs no han degenerado (Fig. 13 d) (Dubowitz and Sewry, 2007; Castillo-Iglesias et al., 2019; Berciano et al., 2020). Esta distribución de las FME contrasta con el tamaño regular de las miofibras de los fascículos de individuos control en las criosecciones transversales del músculo *vastus medialis* teñidas con faloidina-FITC, un marcador para la visualización de la actina polimerizada de los miofilamentos finos (Fig. 13 c).

En definitiva, los cambios en la concentración de SMN en las α -MNs del asta anterior de la médula espinal inducen la pérdida de MNs, de forma que una gran proporción de FME pierden su innervación motora desarrollando un patrón atrófico, al igual que sucede en otras enfermedades neurodegenerativas como la ELA. Sin embargo, una peculiaridad de la AME es la existencia de un patrón de distribución bimodal del tamaño de las FME pues se presentan agrupaciones mixtas en las que coexisten miofibras atróficas (2 a 8 μ m de diámetro) con miofibras hipertróficas (>20 μ m de diámetro) como consecuencia de la reinervación (Castillo-Iglesias et al., 2019; Berciano et al., 2020a).

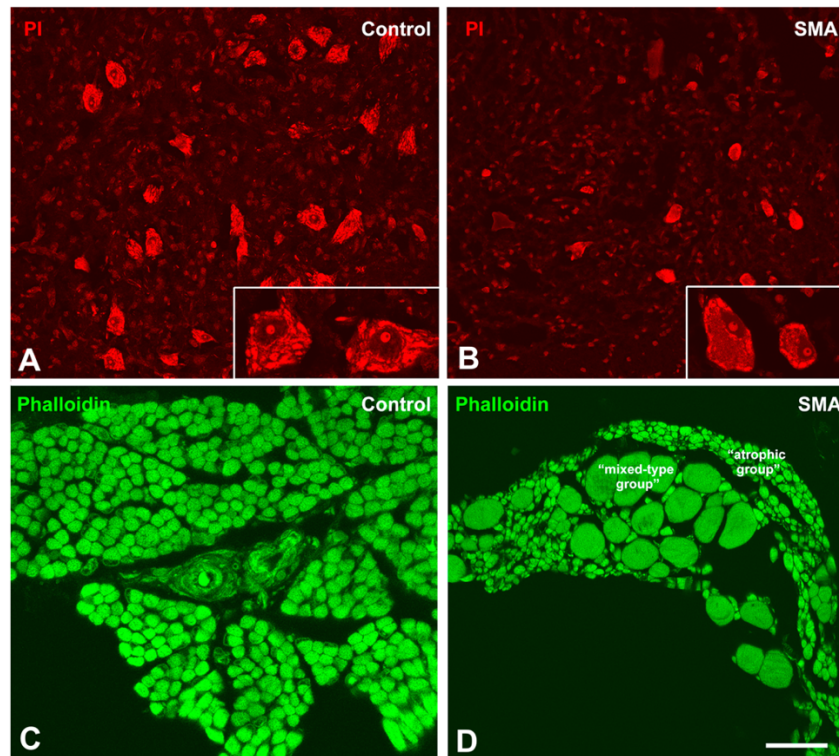


Figura 13. Alteraciones de las MNs espinales y del músculo en la AME humana tipo I. A, B. Criosecciones transversales del asta anterior de la médula espinal teñidas con ioduro de propidio (PI) de un individuo control (A) y un paciente AME tipo I. En la muestra control destaca la abundancia de grandes MNs y el gran desarrollo de la maquinaria de síntesis de proteínas, los grumos de Nissl, intensamente contrastados juntamente con el nucleolo con el PI debido a su enriquecimiento en RNAs (inset). En la muestra de AME tipo I se observa una severa reducción de MNs, así como la disolución de la maquinaria de síntesis de proteínas en el citoplasma perinuclear (cromatolisis central) (inset). C and D. Criosecciones transversales del músculo vastus medialis teñidas con faloidina-FITC para la visualización de la actina polimerizada de los filamentos finos de un individuo control (C) y de un paciente AME tipo I (D). En la muestra control las FME están agrupadas en fascículos y presentan un diámetro bastante regular. En la muestra AME tipo I destaca la presencia de grupos de FME muy atróficas, resultado de la denervación producida por la degeneración de las MNs espinales (miopatía neurogénica), y grupos mixtos que combinan la presencia de fibras hipertróficas, producidas por la poliinervación compensatoria, con fibras atróficas. Tomado de Berciano et al., 2020.

9.2 Distribución sarcomérica de SMN en las FME

Como se ha anticipado en apartados anteriores, la miopatía presente en los individuos con AME no corresponde únicamente a una alteración de la innervación muscular, sino que se planteó la posibilidad de que estos pacientes presentasen una alteración muscular intrínseca producida por la disminución de SMN en las FME. Por lo tanto, en primera instancia fue crucial determinar la posible localización de SMN en la sarcomera.

Estudios realizados en miofibras de *Drosophila* demostraron la presencia de SMN como proteína sarcomérica, así, se localizaba tanto en la banda-I como en la banda-M (Rajendra et al., 2007). Posteriormente, se determinó su presencia en modelos murinos, reclutándose SMN únicamente en los discos-Z (Walker et al., 2008). Gracias a estos

hallazgos en sarcómeras animales se impulsó el estudio de la localización de SMN en las sarcómeras humanas. Berciano et al. (2020), utilizando dos anticuerpos distintos para la detección de SMN con inmunofluorescencia, demostraron un patrón estriado de SMN en secciones longitudinales de las FME. Por lo tanto, el complejo SMN debía estar relacionado con los componentes estructurales sarcoméricos. Para correlacionar la presencia de SMN con los distintos componentes de la sarcómera se realizaron inmunomarcajes dobles de SMN y marcadores moleculares de α -actinina (disco-Z), actina (banda-I), miosina (banda-A) y titina (banda-M) (Berciano et al., 2020a). Los resultados demostraron la colocalización de SMN con actina y titina, lo que implica que el complejo SMN en las muestras humanas se encuentra en la banda-I y la banda-M. Finalmente, destacar la presencia de SMN en forma de gránulos fuertemente asociados a los flancos del disco-Z, pero no formando parte estrictamente de él sino conformando agrupaciones de SMN (Berciano et al., 2020a).

9.3 Interacción de SMN con otras proteínas sarcoméricas

De acuerdo con su localización en la sarcómera SMN interacciona con diversas proteínas presentes en las FME. En primer lugar, SMN se localiza en la banda-M y, entre las proteínas presentes en esta región, juega un papel especialmente importante la titina. Esta proteína gigante (3-4 MDa aproximadamente) es considerada un elemento esencial en el andamiaje de la FME, de manera que permite el mantenimiento de la integridad de la sarcómera durante los ciclos de relajación-contracción (Agarkova et al., 2005; Lange et al., 2019). Por lo tanto, la localización de SMN en la banda-M sugiere una interacción directa o indirecta entre SMN y la titina, de forma que SMN podría tener una función esencial en el mantenimiento de la estructura de la banda-M. De hecho, en fibras hipertróficas de pacientes con AME tipo I en las que la banda-M se encontraba desestructurada debido a la formación de minisarcómeros, SMN tendía a relocalizarse en el disco Z (Berciano et al., 2020a).

Del mismo modo que existe una relación entre la SMN y la titina por su localización en la banda-M, existe una interacción directa o indirecta entre la SMN y la actina por su localización en la banda-I. De esta forma, se podría relacionar la presencia de SMN con el mantenimiento de la arquitectura de la sarcómera a través de su interacción con el citoesqueleto de actina. De hecho, en las miofibras hipertróficas de pacientes con AME que presentan un daño focal o segmental la inmunotinción de SMN pierde su patrón estriado y se distribuye de manera difusa en aquellas localizaciones en las que el citoesqueleto de actina se encuentra desestructurado, mientras se mantiene el patrón normal de localización en las sarcómeras preservadas (Berciano et al., 2020). Finalmente, la disfunción focal de la banda-I en las FME hipertróficas puede llegar a causar una contracción excéntrica, debido a la desestructuración de los filamentos de la sarcómera, contribuyendo al desarrollo de la miopatía propia de la AME. Sin embargo, esta alteración local no se puede considerar un indicador específico de la AME pues también se ha descrito en biopsias de atletas sanos en cuyo entrenamiento tiene gran relevancia los ejercicios de contracción excéntrica (Newham et al., 1983).

Para terminar con las interacciones con otras proteínas sarcoméricas, durante la descripción de la estructura de SMN se planteó la existencia en el extremo C-terminal, tras el dominio Tudor, de un dominio rico en prolinas que resultaba indispensable para la interacción entre SMN y las profilinas. Estas últimas, y en concreto la profilina2, son proteínas esenciales para la regulación dinámica de los filamentos de actina (Chaytaw and Huang, 2018). De manera análoga a lo que sucede en las neuritas, en las FME la SMN podría interaccionar con la profilina2 evitando su fosforilación a través de la vía RhoA/ROCK y actuando como un regulador de la dinámica de polimerización de la actina (Schmandke and Strittmatter, 2007). Por lo tanto, la disminución de la concentración de SMN en el músculo impide la formación de complejos SMN-profilina2, lo que resulta en la hiperfosforilación de la profilina2 y la regulación anormal de la vía RhoA/ROCK que se traduce en una polimerización aberrante de la actina y con ello la alteración de la arquitectura sarcomérica, lo que podría contribuir a las lesiones focales o segmentales presentes en las sarcómeras de individuos con AME tipo I (Hensel and Claus, 2018; Berciano et al., 2020a).

En resumen, la localización de SMN en la banda-I y la banda-M, así como, sus interacciones con la actina, titina y profilina2 sugiere la contribución de SMN al mantenimiento de la estructura de la sarcómera, especialmente en relación con la estructura del citoesqueleto y la dinámica de la actina (Berciano et al., 2020a).

9.4 Alteraciones de las FME derivadas de la disminución de SMN

Para determinar si la disminución de SMN en las FME estaba en relación con las alteraciones focales de las miofibras hipertróficas Berciano et al. (2020a) realizaron secciones longitudinales del músculo *vastus medialis* de individuos control y de un paciente AME tipo I. Así, en el corte semifino teñido con azul de toluidina del control se observa la estriación transversal típica de bandas claras y oscuras propia de una sarcómera íntegra y, al microscopio electrónico, se confirmó la perfecta organización de los filamentos finos de actina en la banda-I y de los filamentos gruesos de miosina en la banda A, así como del disco-Z y la banda-M (Fig. 14 a, b). Por el contrario, las crio secciones teñida con faloidina-FITC del músculo *vastus medialis* de un paciente con AME tipo I revelaron una lesión focal transversal que, analizada en detalle mediante microscopía electrónica, consistía en una desestructuración selectiva de los filamentos finos de actina (Fig. 14 e) con alteración severa de la estructura sarcomérica (Fig. 14 f). Esta alteración se acompañaba de la severa desorganización de las bandas A e I, que resultan irreconocibles, junto a la fragmentación de los discos Z (Berciano et al., 2020).

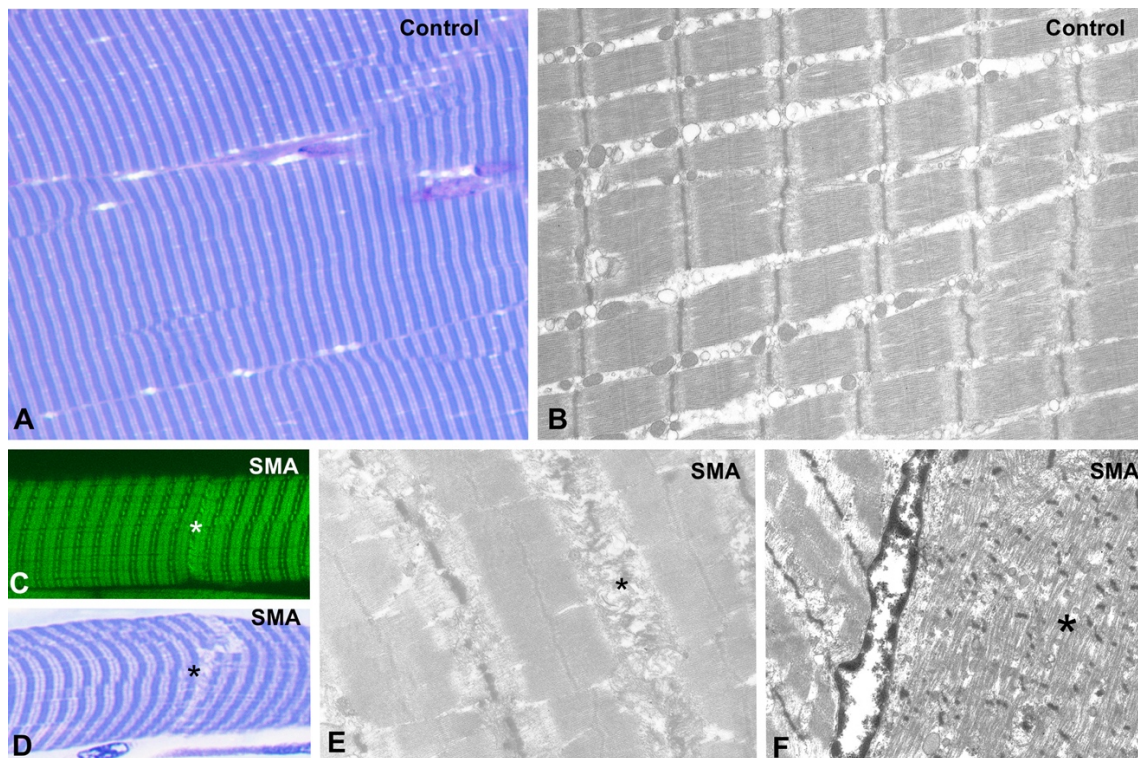


Figura 14. Alteraciones estructurales de las FME humanas de un paciente AME tipo I. (A, B) Corte semifino teñido con azul de toluidina y microscopía electrónica de secciones longitudinales de FME de músculo vastus medialis de un individuo control. Destaca la típica estriación transversal de bandas claras (banda I con el disco Z) y oscuras (banda A) en el corte semifino (A). La microscopía electrónica ilustra la típica alineación en paralelo de las miofibrillas en las que se identifica claramente la banda I de filamentos finos de actina, el disco Z, la banda A de filamentos gruesos de miosina y, en el medio de esta, la estrecha banda M (B). (C, D) Microscopía óptica de corte semifino teñido con azul de toluidina (C) y criosección teñida con faloidina-FITC que ilustra una lesión focal transversal (asteriscos) de una FME hipertrófica de un paciente AME tipo I. (E) Detalle de microscopía electrónica de la lesión focal que afecta selectivamente a la banda I de filamentos de actina (asterisco). (F) Disrupción severa de la estructura de las sarcómeras (asterisco) en una FME hipertrófica del paciente AME tipo I. Nótese la severa desorganización de las bandas A e I, que son irreconocibles, y la fragmentación de los discos Z. Se observa una segunda FME con una ultraestructura relativamente bien preservada en la que se identifican claramente la estructura de las sarcómeras con las bandas A e I y los discos Z. Tomado de Berciano et al., 2020.

Para reforzar la hipótesis de que la existencia de alteraciones focales o segmentarias en las fibras hipertróficas (no denervadas) del paciente AME tipo I representa una respuesta intrínseca de las FME al déficit de SMN, el grupo de Lafarga realizó un estudio en el modelo murino SMN Δ 7 de AME que tiene niveles muy reducidos de SMN en el músculo (Berciano et al., 2020b). Los autores utilizaron secciones longitudinales de músculo *tibialis anterior* teñidas con faloidina-FITC y contrastadas con yoduro de propidio de los ratones control y AME. Mientras las FME control presentaban la estructura típica de la sarcómera con estriaciones transversales (Fig. 15 a), en las fibras del modelo de AME se observaban concentraciones aberrantes focales de filamentos de actina intensamente contrastados con la faloidina-FITC (Fig. 15 c). Con microscopía electrónica estas lesiones focales se caracterizaban por la severa desestructuración de las sarcómeras con pérdida de filamentos gruesos y discos-Z junto con la acumulación de filamentos finos de actina (Berciano et al., en preparación). Sin

embargo, es destacable que las sarcómeras estaban preservadas en las zonas adyacentes a la lesión focal. En secciones transversales de las lesiones focales frecuentemente había una afectación preferentemente de la porción central de las fibras, mientras que la estructura sarcomérica estaba mejor preservada en las regiones subsarcolémicas (Fig. 15 d, e). Finalmente, hay que destacar que la pérdida de miofilamentos gruesos y la acumulación de filamentos finos en las lesiones focales o segmentarias es consistente con una disfunción de la dinámica de polimerización de los filamentos de actina, potencialmente dependiente de la hiperfosforilación de la profilina2 y de la disregulación de la vía RhoA/ROCK (Hensel and Claus, 2018; Berciano et al, 2020a).

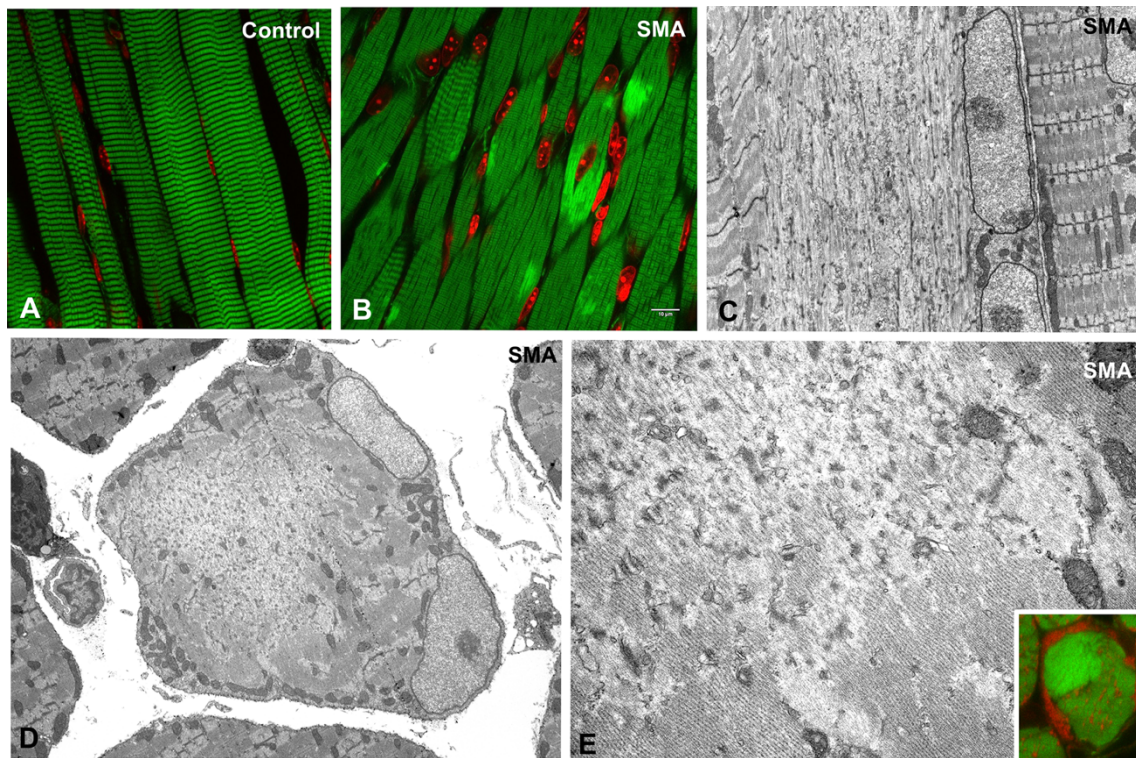


Figura 15. Alteraciones de las FME en el modelo murino SMN Δ 7 de AME tipo I. (A, B) Secciones longitudinales del músculo tibialis anterior teñidas con faloidina-FITC y contrastadas con ioduro de propidio de un ratón control (A) y AME (B). Mientras que en la muestra control las FME presentan la típica estriación transversal, en la muestra AME aparecen concentraciones focales de filamentos de actina intensamente contrastados con la faloidina-FITC. (C) Detalle de microscopía electrónica de la lesión focal de una FME que ilustra la desestructuración de las sarcómeras con pérdida de filamentos gruesos y discos Z y acompañada de la acumulación de filamentos de actina. La estructura de las sarcómeras está preservada en las zonas adyacentes a la lesión focal. Nótese también la acumulación de mionúcleos en la región. (D, E) Sección transversal de una FME a nivel de una lesión focal que afecta preferentemente a la porción central de la fibra, mientras la estructura de las sarcómeras está parcialmente preservada en la región subsarcolémica. Destaca en la zona de lesión la pérdida de miofilamentos gruesos y la acumulación de filamentos finos, como se confirma en el inset de microscopía óptica que ilustra un área enriquecida en actina F e intensamente teñida con faloidina-FITC. (Cortesía de Berciano et al., manuscrito en preparación).

En definitiva, la reducción de los niveles de SMN en los individuos con AME tipo I, y con ello la aparición de miofibras hipertróficas, se asocia a la aparición de lesiones focales o segmentales en las que se observan alteraciones de la actina junto con otras proteínas del citoesqueleto, así como la formación de minisarcómeros en las que SMN se recluta a los discos-Z. Por lo tanto, la desestructuración de los componentes de la sarcómera por deficiencia de SMN provocan una miopatía intrínseca y contribuyen a la severidad de la miopatía neurogénica propia de la AME (Berciano et al., 2020a).

No se puede olvidar que la reducción de SMN no solamente afecta a las miofibras en relación con la dinámica de la actina o la ordenación de los componentes estructurales de la sarcómera, sino que repercute directamente en otras funciones cruciales para la homeostasis de las FME, pues, en definitiva, SMN es una proteína esencial para la homeostasis celular. Así, tal y como se describió en las MNs, SMN es una proteína central en la biogénesis de los snRNPs espliceosomales, el procesamiento del mRNA, el transporte de sustancias mediante endocitosis, la homeostasis mitocondrial y el mantenimiento de la unión neuromuscular (Matera and Wang, 2014; Singh et al., 2017; Chaytow et al., 2018; Berciano et al., 2020b).

Por lo tanto, la deficiencia de SMN en las miofibras tiene un impacto directo sobre la maquinaria de transcripción y procesamiento del RNA que, unida a las alteraciones estructurales de la sarcómera (especialmente de la dinámica de actina), puede inducir el desarrollo de una miopatía intrínseca, SMN dependiente. Esta alteración primaria de las FME, junto con la denervación secundaria a la degeneración de α -MNs del asta anterior, deben representar componentes esenciales en la patogénesis de la miopatía de los pacientes con AME.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agarkova I, Perriard J-C (2005) The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 15:477–485. doi: 10.1016/j.tcb.2005.07.001
- Baltanas, F.C., Casafont, I., Weruaga, E., Alonso, J.R., Berciano, M.T., Lafarga, M., (2011). Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol.* 21, 374–388.
- Battle DJ, Lau CK, Wan L, Deng H, Lotti F, Dreyfuss G (2006) The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol Cell* 23:273-279.
- Berciano, M.T., Novell, M., Villagra, N.T., Casafont, I., Bengoechea, R., Val-Bernal, J.F., Lafarga, M., (2007). Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J. Struct. Biol.* 158, 410–420.
- Berciano, M.T., Castillo-Iglesias, M.S., Val-Bernal, J.F., Lafarga, V., Rodríguez-Rey, J.C., Lafarga, M., Tapia, O., (2020a) Mislocalization of SMN from the I-band and M-band in human skeletal myofibers in spinal muscular atrophy associates with primary structural alterations of the sarcomere. *Cell Tissue Research* (in press).
- Berciano, M.T., Puente-Bedia, A., Medina-Samamé, L.A., Rodríguez-Rey, J.C., Calderó, J., Lafarga, M., Tapia, O., (2020b) The antisense oligonucleotide nusinersen (Spinraza™) ameliorates motor function, rescues Cajal body biogenesis and normalizes poly(A)RNA distribution in motor neurons of the SMN Δ 7 mouse model of AME. *Scientific Reports* (in press).
- Bernabò, P., Tebaldi, T., Groen, E., Lane, F. M., Perenthaler, E., Mattedi, F., Newbery, H. J., Zhou, H., Zuccotti, P., Potrich, V., Shorrock, H. K., Muntoni, F., Quattrone, A., Gillingwater, T. H., & Viero, G. (2017). In Vivo Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. *Cell reports*, 21(4), 953–965. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.010>
- Boisvert, F.M., Cote, J., Boulanger, M.C., Cleroux, P., Bachand, F., Autexier, C., Richard, S., (2002). *Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing.* *J. Cell Biol.* 159, 957–969.
- Bottai, D. and Adami, R. (2013). Spinal Muscular Atrophy: New Findings for an Old Pathology. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland). 23. 10.1111/bpa.12071.
- Bowerman M, Shafey D, Kothary R. (2007) Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci.* 2007; 32:120–131.

- Castillo-Iglesias, M.S., Berciano, M.T., Narcis, J.O. et al. (2019) *Reorganization of the nuclear compartments involved in transcription and RNA processing in myonuclei of type I spinal muscular atrophy*. *Histochem Cell Biol* **152**, 227–237. <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01792-6>
- Chaytow, H., Huang, Y. T., Gillingwater, T. H., & Faller, K. (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(21), 3877–3894. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2849-1>
- Cho S, Dreyfuss G (2010) A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev* 24:438-442. CrossRef Medline.
- Cioce, M., Boulon, S., Matera, A.G., Lamond, A.I., (2006). UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *J. Cell Biol.* 175, 401–413.
- Custer SK, Todd AG, Singh NN, Androphy EJ (2013) Dilycine motifs in exon 2b of SMN protein mediate binding to the COPI vesicle protein α -COP and neurite outgrowth in a cell culture model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 22:4034-4052.
- Custer, S. K., & Androphy, E. J. (2014). Autophagy dysregulation in cell culture and animals' models of spinal muscular atrophy. *Molecular and cellular neurosciences*, 61, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.06.006>
- D'Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F.D. et al. (2011) Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 6, 71. Available on: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-71>.
- Deinhardt K, Schiavo G (2005) Endocytosis and retrograde axonal traffic in motor neurons. *Biochem Soc Symp* 72:1139-150.
- Donlin-Asp PG, Rossoll W, Bassell GJ. (2017) Spatially and temporally regulating translation via mRNA-binding proteins in cellular and neuronal function. *FEBS Lett.* 2017; 591:1508–1525.
- Dubowitz V, Sewry CA. Muscle Biopsy. Practical Approach, Saunders-Elsevier.
- Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG. (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19:287–332.
- Fallini C, Zhang H, Su Y, Silani V, Singer RH, Rossoll W, Bassell GJ (2011) The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J Neurosci* 31:3914-3925.
- Fallini C, Rouanet JP, Donlin-Asp PG, Guo P, Zhang H, Singer RH, Rossoll W, Bassell GJ (2014) Dynamics of survival of motor neuron (SMN) protein interaction with the mRNA-binding protein IMP1 facilitates its trafficking into motor neuron axons. *Dev Neurobiol* 74:319-332.

- Fallini, C., Donlin-Asp, P. G., Rouanet, J. P., Bassell, G. J., & Rossoll, W. (2016). Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(13), 3811–3820. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2396-15.2016>
- Freiburg A., & Gautel M. (1996). A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. *FEBS Journal*, 235(1–2), 317–323.
- Giavazzi A, Setola V, Simonati A, Battaglia G (2006) Neuronal-specific roles of the survival motor neuron expression protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:267-277.
- Glock C, Heumüller M, Schuman EM. (2017) mRNA transport and local translation in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2017; 45:169–177.
- Hebert, M.D., Shpargel, K.B., Ospina, J.K., Tucker, K.E., Matera, A.G., (2002). *Coilin methylation regulates nuclear body formation*. *Dev. Cell* 3, 329–337.
- Hensel N, Claus P (2018) The Actin cytoskeleton in AME and ALS: How does it contribute to motoneuron degeneration? *Neuroscientist* 24:54–72.
- Herencia mendeliana en línea en el hombre, OMIM®. Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD. Número MIM: {253300}: {15/02/2018}: URL de la World Wide Web: <https://omim.org/entry/253300>.
- Herencia mendeliana en línea en el hombre, OMIM®. Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD. Número MIM: {253550}: {23/01/2018}: URL de la World Wide Web: <https://omim.org/entry/253550>.
- Herencia mendeliana en línea en el hombre, OMIM®. Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD. Número MIM: {253400}: {23/01/2018}: URL de la World Wide Web: <https://omim.org/entry/253400>.
- Herencia mendeliana en línea en el hombre, OMIM®. Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD. Número MIM: {271150}: {26/06/2017}: URL de la World Wide Web: <https://omim.org/entry/271150>.
- Hosseinibarkooie S, Peters M, Torres-Benito L, et al. (2016) The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue AME Phenotype. *Am J Hum Genet*. 2016;99(3):647–665. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.07.014
- Kaur J, Debnath J (2015) Autophagy crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:461-472.
- Kierszenbaum, A. L. y Tres, L. L. (2012) *Hitología y biología celular. Introducción a la anatomía patológica*. Elsevier-Saunders, 3ª ed.

- Kwon DY, Motley WW, Fischbeck KH, Burnett BG (2011) Increasing expression and decreasing degradation of SMN ameliorate the spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Hum Mol Genet* 20:3667–3677
- Kye, M. J., Niederst, E. D., Wertz, M. H., Gonçalves, I., Akten, B., Dover, K. Z., Peters, M., Riessland, M., Neveu, P., Wirth, B., Kosik, K. S., Sardi, S. P., Monani, U. R., Passini, M. A., & Sahin, M. (2014). SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Human molecular genetics*, 23(23), 6318–6331. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu350>
- Lafarga, M., Andres, M.A., Berciano, M.T., Maquiera, E., (1991). *Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat*. *J. Comp. Neurol.* 308, 329–339.
- Lafarga, M., Lerga, A., Andres, M.A., Polanco, J.I., Calle, E., Berciano, M.T., (1997). Apoptosis induced by methylazoxymethanol in developing rat cerebellum: organization of the cell nucleus and its relationship to DNA and rRNA degradation. *Cell Tissue Res.* 289, 25–38.
- Lange S, Pinotsis N, Agarkova I, Ehler E (2019) The M-band: The underestimated part of the sarcomere. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.02.003
- Lefebvre S et al (1995) *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene*. *Cell* 80:155-165.
- Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., Melki, J., (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 16, 265–269.
- Leterrier C, Dubey P, Roy S. (2017) The nano-architecture of the axonal cytoskeleton. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Dec;18(12):713-726. doi: 10.1038/nrn.2017.129.
- Li H, Custer SK, Glison T, Hao LT, Beattie CE, Androphy EJ (2015) α -COP binding to the survival motor neuron protein SMN is required for neuronal process outgrowth. *Hum Mol Genet* 24:7295-7307.
- Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motoneurons protein. *EMBO J.* 15, 3555–3565.
- Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90:1013-1021.
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the AME-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9:259-265. CrossRef Medline.

- Lotti, F. et al. (2012) An SMN-Dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* 151, 440–454.
- Machyna, M., Heyn, P., Neugebauer, K.M., (2013). *Cajal bodies: where form meets function*. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 4, 17–34.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
- Markowitz, J. A., Singh, P. & Darras, B. T. (2012) Spinal muscular atrophy: a clinical and research update. *Pediatr. Neurol.* 46, 1–12.
- Martínez-Hernández R, Soler-Botija C, Also E, et al (2009) The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:474–481. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181a10ea1.
- Martínez-Hernández R, Bernal S, Also-Rallo E, Alias L, Barcelo MJ, Hereu M, Esquerda JE, Tizzano EF. (2013) Synaptic defects in type I spinal muscular atrophy in human development. *J Pathol.* 2013; 229:49–61.
- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(2), 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2019). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 12(1), e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Munsat TL, Davies KE (1992) International AME consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Discord*.
- Narcís J., (2019). *Disfunción de la biogénesis de pre-mRNAs y pre-rRNAs en motoneuronas en el modelo murino SMNΔ7 de atrofia muscular espinal*.
- Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RH (1983) Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci* 61:109–22. doi: 10.1016/0022-510x(83)90058-8
- Novotny, I., Blazikova, M., Stanek, D., Herman, P., Malinsky, J., (2011). *In vivo kinetics of U4/ U6.U5 tri-snRNP formation in Cajal bodies*. *Mol. Biol. Cell* 22, 513–523.
- Oprea, G. E., Kröber, S., McWhorter, M. L., Rossoll, W., Müller, S., Krawczak, M., Bassell, G. J., Beattie, C. E., & Wirth, B. (2008). Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5875), 524–527. <https://doi.org/10.1126/science.1155085>
- Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier c, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000) Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 9:47-56.

- Pellizzoni L, (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 8, 340–5.
- Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 298:1775-1779.
- Renvoise, B., Colasse, S., Burlet, P., Viollet, L., Meier, U.T., Lefebvre, S. (2009). The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1181–1189.
- Periyakaruppi A, de la Fuente S, Arumugam S, Bahí N, Garcera A, Soler RM. (2016) Autophagy modulators regulate survival motor neuron protein stability in motoneurons. *Exp Neurol.* 2016; 283:287–297.
- Rademacher S, et al. (2017) Metalloprotease-mediated cleavage of PlexinD1 and its sequestration to actin rods in the motoneuron disease spinal muscular atrophy (AME) *Hum Mol Genet.* 2017; 26:3946–3959.
- Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, et al (2007) A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol* 176:831–41. doi: 10.1083/jcb.200610053
- Riessland M, Kaczmarek A, Schneider S, et al. (2017) Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am J Hum Genet.* 2017;100(2):297–315. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.005
- Riancho, J., Ruiz-Soto, M., Villagrà, N.T., Berciano, J., Berciano, M.T., Lafarga, M., (2014). Compensatory motor neuron response to chromatolysis in the murine hSOD1 G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo Sapiens*. *Hum Genet* 108:255-266.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801-812.
- Schmandke, A., Schmandke, A., & Strittmatter, S. M. (2007). ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(5), 454–469. <https://doi.org/10.1177/1073858407303611>
- Tapia, O., Bengoechea, R., Berciano, M.T., Lafarga, M., (2010). *Nucleolar targeting of coilin is regulated by its hypomethylation state.* *Chromosoma* 119, 527–540.

- Tapia, O., Bengoechea, R., Palanca, A. *et al.* (2012) Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy. *Histochem Cell Biol* 137, 657–667.
- Tapia, O., Narcís, O., Riancho, J., Tarabal, O., Piedrafita, L., Calderó, J., Berciano M.T., Lafarga, M., (2017) Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiol Dis.* 2017 Dec; 108:83-99.
- Thompson LW, Morrison KD, Shirran SL, Groen EJN, Gillingwater TH, Botting CH, Sleeman JE (2018) Neurochondrin interacts with SMN protein suggesting a novel mechanism for spinal muscular atrophy pathology. *J Cell Sci.* Available on: <https://doi.org/10.1241/jcs,211482>.
- Ting CH, Wen HL, Liu HC, Hsieh-Li HM, Li H, Lin-Chao S (2012) The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Golgi network. *PLoS One* 7:e51826.
- Tisdale, S., & Pellizzoni, L. (2015). Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(23), 8691–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0417-15.2015>
- van Bergeijk J, Rydel-Könecke K, Grothe C, Claus P. (2007) The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus. *FASEB J.* 2007; 21:1492–1502.
- Villagrà NT, Berciano J, Altable M, Navascués J, Casafont I, Lafarga M, Berciano MT (2004) PML bodies in reactive sensory ganglion neurons of the Guillain-Barré syndrome. *Neurobiol Dis* 16:158–168
- Walker MP, Rajendra TK, Saieva L, et al (2008) SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet* 17:3399–3410. doi: 10.1093/hmg/ddn234
- Wang K., McClure J., & Tu A. (1979). Titin: Major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(8), 3698–3702.
- Welsch, U., (2009) Sobotta. Histología. Madrid: Panamericana.
- Wen HL, Lin YT, Ting CH, Lin-Chao S, Li H, Hsieh-Li HM. (2010) Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2010; 19:1766–1778.
- Wirth, B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (AME). *Hum. Mutat.* 15, 228–237.
- Yong J, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2002) Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex. *EMBO J* 21:1188-1196.

- Zhang Z et al (2013) Dysregulation of synaptogenesis genes antecedes motor neuron pathology in spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:19348-19353.
- Zhang H, Xing L, Rossol W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ (2006) Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci* 26:8622-8632.
- Zot A. S., & Potter J. D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 16(1), 535–559.